



**Dianne Marie Barroso  
Catalão**

**Caracterização funcional do Anticorpo Monoclonal  
Humano BH1**



**Dianne Marie Barroso  
Catalão**

**Caracterização funcional do Anticorpo Monoclonal  
Humano BH1**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Dr. António Correia, Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e a Dra. Susana Magadán Mompó Professora Coordenadora sem agregação do Instituto Superior de Saúde do Alto Ave.

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e ao meu noivo por todo o carinho, amor, admiração, apoio e compreensão que me têm dado ao longo do meu percurso.

## **O júri**

Presidente

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Abreu Silva**

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **Vogais**

**Prof. Doutor António Carlos Matias Correia**

Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Susana Magadán Mompó**

Professora adjunta do Instituto Superior de Saúde do Alto Ave

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Virgília Sofia Silva**

Investigadora de pós-doutoramento do laboratório associado CESAM, Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

A elaboração deste trabalho nunca teria sido possível sem a colaboração de muitas pessoas, às quais quero deixar o meu sincero agradecimento, nomeadamente:

À Doutora Susana Magadán, minha orientadora, por ter aceite orientar esta tese, ter acreditado em mim, pela sua disponibilidade, ajuda e companheirismo.

Ao Doutor António Correia pelo seu incentivo, apoio e compreensão.

Ao Instituto Superior de Saúde do Alto Ave (ISAVE) por me ter disponibilizado as suas instalações para a elaboração deste trabalho.

Ao grupo de Imunologia da Faculdade de ciências da Universidade de Vigo (Espanha) por me terem disponibilizado diversas amostras, e as suas instalações para a execução deste trabalho.

À Mestre Alexandra Pinto pelo seu incansável incentivo, amizade e disponibilidade.

À Dra. Rita Caldas e Dra. Adriana Duarte pelos bons momentos que passamos juntas no laboratório, e constante apoio mútuo.

Aos meus pais pelo seu amor, carinho, atenção, apoio, disponibilidade e por sempre terem acreditado em mim.

Ao meu irmão pelo companheirismo, ajuda, disponibilidade e alegria contagiante que o caracterizam.

A ti Maciel, por todo o amor, carinho, paciência, tolerância, atenção, compreensão, ajuda e disponibilidade que sempre tiveste para comigo.

## Palavras-chave

Imunoglobulinas, Anticorpos Monoclonais, Terapia tumoral, HLA-II.

## Resumo

Embora, existam novas terapias e avanços no tratamento do cancro, por vezes, os benefícios esperados não são alcançados. O drama humano de quem vive diariamente com esta doença, o alto custo, económico e social, comprova a pertinência em desenvolver novos estudos para encontrar terapias alternativas, eficazes e inovadoras para o tratamento das doenças neoplásicas, como os Anticorpos Monoclonais Humanos.

Moléculas HLA classe II têm sido consideradas como uma boa molécula-alvo para o uso na imunoterapia, devido à sua alta expressão em algumas células de leucemia e linfoma. Recentemente, alguns anticorpos monoclonais anti-HLA classe II, foram desenvolvidos, como Hu1D10 (humanizado) e Ch-Lym1 (quimérico). O grupo de Imunologia da Universidade de Vigo (Espanha), tem obtido vários anticorpos Monoclonais Humanos usando ratos transgénicos, como o anticorpo BH1 que reconhece a molécula HLA-II. Este anticorpo actua muito eficientemente na presença de complemento, frente a células tumorais, matando-as, o que sugere que ele poderia ser um potencial agente no tratamento de várias doenças malignas.

O principal objectivo do estudo foi determinar se o anticorpo BH1 poderia activar outros mecanismos anti-tumorais, principalmente modificar o crescimento celular e activar a fagocitose.

Os nossos resultados indicam que o efeito de BH1 sobre linhas de células B, originam um crescimento tumoral diferente de outros anti-anticorpos HLA classe II (Ch-Lym1) e a capacidade de BH1 para activar a fagocitose "in vitro" é menor do que a capacidade do Ch-Lym1. Portanto, sugerimos a mudança do isótipo IgM do BH1 para um isótipo IgG humano que poderá melhorar a sua aplicação em terapias humanas.

## Keywords

Immunoglobulin, Antibodies Monoclonal, Therapeutic tumor, HLA-II

## Abstract

Although, there are new therapies and advances in the cancer treatment, sometimes the benefits expected are not produced. The human drama who lives daily with this disease, the high cost, economic and social; proves the evidence to develop new studies to find alternative, effective and innovative therapies to the neoplastic diseases treatment, like Human Monoclonal Antibodies.

HLA class II molecules have been considered as a good target molecule for use in immunotherapy because of their high expression in some leukemia and lymphoma cells. Recently, some monoclonal antibodies anti-HLA class II have been developed, like Hu1D10 (humanized) and Ch-Lym1 (chimeric). The Immunology group of University of Vigo (Spain) has obtained several Human monoclonal antibodies using transgenic mice, like BH1 that recognizes the molecule HLA-II. This antibody kills very efficiently tumour cells in presence of human complement, suggesting that it could be a potential agent in the treatment of several malignancies.

The main objective of our study was to determine if BH1 antibody could activate other anti-tumour activities, mainly modify the cellular growth and activate phagocytosis.

Our results indicate that the effect of BH1 on tumoral B cell lines growth is different to other anti-HLA class II antibodies (Ch-Lym1) and the ability of BH1 to activate phagocytosis "in vitro" is lower than the Ch-Lym1 activity. So, we suggest that the isotype changing of BH1 to human IgG could improve its application in human therapy.

---

## Índice

|  |    |
|--|----|
| 1- Introdução  | 6  |
| 1.1- Características gerais dos anticorpos   | 8  |
| 1.2- Classe das imunoglobulinas  | 10 |
| 1.3- Origem da diversidade dos anticorpos  | 14 |
| 1.3.1- Genética da cadeia pesada (H)   | 14 |
| 1.3.2- Genética da cadeia leve (L)   | 14 |
| 1.3.3- Reorganização génica das Imunoglobulinas  | 15 |
| 1.4- Dos anticorpos séricos aos anticorpos monoclonais                                   | 16 |
| 1.4.1- Produção de Anticorpos Monoclonais  | 17 |
| 1.4.2- Evolução dos Anticorpos Monoclonais   | 19 |
| 1.4.3 – Anticorpos Monoclonais Totalmente Humanos  | 24 |
| 1.4.4- Aplicações Gerais dos Anticorpos Monoclonais                                      | 25 |
| 1.4.5- Anticorpos Monoclonais na terapia anti – tumoral                                  | 26 |
| 2- Objectivos  | 32 |
| 3- Material e Métodos  | 34 |
| 3.1- Anticorpos Monoclonais utilizados neste estudo                                      | 34 |
| 3.2- Obtenção e processamento de amostras biológicas                                     | 35 |
| 3.2.1- Amostras de rato  | 35 |
| 3.3- Amostras Humanas  | 36 |
| 3.3.1- Sangue periférico   | 36 |
| 3.3.2- Obtenção de células mononucleares de sangue periférico                            | 36 |
| 3.3.3- Obtenção de polimorfonucleares  | 36 |
| 3.4- Linhas celulares tumorais   | 37 |
| 3.5- Contagem e determinação da viabilidade celular                                      | 37 |
| 3.6- Quantificação de Anticorpos Monoclonais   | 38 |
| 3.6.1- Quantificação do anticorpo monoclonal   | 38 |
| 3.7- Análise do reconhecimento das linhas tumorais mediante imunofluorescência indirecta | 39 |
| 3.8- Estudos funcionais realizados com BH1, Ch-Lym1 e hAIM-29.16                         | 39 |
| 3.8.1- Agregação homotípica induzida pelos anticorpos                                    | 39 |
| 3.9- Avaliação da fagocitose   | 40 |
| 3.9.1- Ensaio “in vitro” de activação da fagocitose                                      | 40 |
| 4- Resultados  | 42 |
| 5- Discussão e conclusão   | 50 |
| 6- Bibliografia  | 52 |



---

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela nº.1</b> – Classes de imunoglobulinas.....  | 9  |
| <b>Tabela nº.2</b> – Funções efectoras desempenhadas pelas imunoglobulinas.....   | 10 |
| <b>Tabela nº.3</b> – Vectores utilizados na introdução de <i>locis</i> das imunoglobulinas humanas nos genes de rato.....   | 24 |
| <b>Tabela nº.4</b> – Anticorpos monoclonais utilizados na terapia, suas aplicações e registo efectuado pela FDA (Food and Drug Administration) ou EMEA (European Medicines Agency)..... | 26 |
| <b>Tabela nº.5</b> – Anticorpos monoclonais utilizados neste estudo e suas características.....   | 34 |
| <b>Tabela nº.6</b> – Linhas tumorais utilizadas, e suas características.....  | 37 |
| <b>Tabela nº.7</b> – Anticorpos utilizados na técnica de Elisa para determinar a concentração de Ac-Mos Humanos no sobrenadante dos hibridomas.....                                     | 38 |
| <b>Tabela nº. 8</b> – Níveis de Produção de anticorpo pelos hibridomas BH1 e hAIM-29.16.....  | 42 |
| <b>Tabela Nº.9</b> – Agregação das células tumorais Jurkat, Daudi, Hmy-2 e Raji na presença de anticorpos a 37°C e a 4°C... ..  | 44 |
| <b>Tabela nº. 10-</b> Activação da fagocitose mediada pelos anticorpos BH1 e Ch-Lym1.....   | 46 |

---

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura nº.1</b> – Estrutura de uma imunoglobulina e tratamento com enzimas.....  | 8  |
| <b>Figura nº.2</b> – Estrutura das diferentes classes de imunoglobulinas.....   | 13 |
| <b>Figura nº.3</b> – Representação esquemática da reorganização dos segmentos génicos $V_kJ_k$ e $V_HD_HJ_H$ para formar um gene funcional que codifica a cadeia leve e pesada de uma imunoglobulina.....   | 15 |
| <b>Figura nº.4</b> – Obtenção de hibridomas para produção de anticorpos monoclonais .....   | 17 |
| <b>Figura nº.5</b> – Seleção e cultura de Hibridomas .....  | 18 |
| <b>Figura nº.6</b> – Estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana, consistindo em duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), ligadas por pontes dissulfureto. Apresentação das respectivas regiões variáveis (V) e constantes (C). Também é mostrado um desenho comparativo de anticorpos quiméricos, humanizados, e scFv. As sequências humanas são representadas com coloração laranja, sendo as sequências de rato representadas com coloração vermelha..... | 22 |
| <b>Figura nº.7</b> – Mecanismos desenvolvidos pelos anticorpos nus e conjugados.....  | 30 |
| <b>Figura nº.8</b> – Gráfico uniparamétrico obtido pelo Citómetro de fluxo, de modo a avaliar o reconhecimento das linhas tumorais Hmy-2, Raji, Daudi e Jurkat, pelo anticorpo IgM humano presente nas ascites obtidas através do hibridoma BH1.....  | 43 |
| <b>Figura nº.9</b> – Agregação das células Hmy-2 após incubação durante 4 horas na presença de meio de cultura com concentração de 5µg/ml de anticorpo BH1, hAIM-29.16 e Ch-Lym1.....   | 45 |
| <b>Figura nº.10</b> – Indução da fagocitose das células tumorais Hmy-2 pelos PBMC na presença do anticorpo BH1, hAIM-29.16 e Ch-Lym1.....   | 47 |
| <b>Figura nº.11</b> – Indução da fagocitose das células tumorais Hmy-2 pelos PMN na presença do anticorpo BH1, hAIM-29.16 e Ch-Lym1.....  | 48 |

---

## Abreviaturas

**ABTS**- 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)  
**Ac(s)**- Anticorpo(s)  
**AcMos**- Anticorpos Monoclonais  
**ADCC**- Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo  
**Ag(s)**- Antígeno(s)  
**ATCC**- do inglês "American Type Culture Collection"  
**BSA**- Albumina de Soro bovino  
**°C**- Grau Centígrado  
**CDC**- Citotoxicidade Dependente de Complemento  
**CDR**- Região determinante de complementaridade  
**CFSE**- do inglês "Carboxyfluorescein succinimidyl ester"  
**C<sub>H</sub>**- Região constante da cadeia pesada das imunoglobulinas  
**C<sub>L</sub>**- Região constante da cadeia leve das imunoglobulinas  
**DMAE**- Degeneração da mácula associada à idade  
**DMSO**- Dimetilsulfóxido  
**DNA**- Ácido desoxirribonucleico  
**EGFR**- Receptor de crescimento epidérmico  
**ELISA**- do inglês "Enzyme Linked Immunosorbent assay"  
**EMEA**- do inglês "European Medicines Agency"  
**Fab**- Fragmento de ligação ao antígeno  
**Fc**- do inglês "Fragment crystalline"  
**FcεRI**- Receptor para Fc de elevada afinidade  
**FCS**- Soro Bovino Fetal  
**FDA**- do inglês "Food and Drug Administration"  
**FITC**- do inglês "Isotiocianato de fluoresceína"  
**GM-CSF**- Fator Estimulante de Colônias de granulócitos e macrófagos  
**HACs**- Cromossomas artificiais de leveduras e humanos  
**HACA**- do inglês "human anti-chimeric antibodies"  
**HAHA**- do inglês "Human Anti-Humanized Antibodies"  
**HLA**- Histocompatibilidade Humano  
**HAMA**- do inglês "Human anti-mouse antibody"  
**Ig(s)**- Imunoglobulina(s)  
**ISAVE**- Instituto Superior de Saúde do Alto Ave  
**Kd**- Kilodalton  
**MC**- Macrófago  
**ml**- Mililitro  
**NK**- Célula Natural Killer

---

**PBMC**- Células mononucleares de sangue periférico humano  
**PBS**- Tampão de solução fosfato  
**PMN**- Polimorfonuclear  
**PNH**- Hemoglobinúria paroxística noturna  
**r.p.m.**- Rotações por minuto  
**RSV**- Vírus sincicial respiratório  
**scFv**- Fragmento variável de cadeia simples das imunoglobulinas  
**TNF- $\alpha$** - do inglês "Tumor necrosis factor-alpha".  
**USA**- Estados Unidos da América  
**V<sub>H</sub>**- Região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas  
**V<sub>L</sub>**- Região variável da cadeia leve das imunoglobulinas  
**YACs**- Cromossomos artificiais de leveduras e humanos  
 **$\mu$ g**- Micrograma

---

## 1- Introdução

O ser humano desenvolveu ao longo do tempo um sistema altamente adaptado e específico, associado à defesa do organismo: designado por sistema imune.

O sistema imune oferece vários mecanismos que apresentam como função a protecção do organismo frente a agentes patogénicos (vírus, bactérias, fungos, parasitas), células danificadas ou envelhecidas, mantendo a homeostase interna (Weissman I., 1994).

As “balas mágicas”, utilizadas pelo sistema imune na sua acção de defesa do organismo são os anticorpos, tendo o seu nome origem a partir do termo alemão “*antiKörper*” utilizado por Karl Landsteiner e Paul Ehrlich (entidades discretas: “Körper” que actuam contra as toxinas bacterianas: “anti”). Estas moléculas são conhecidas há imensos anos (últimas décadas do século XIX), tendo sido descobertas na era da microbiologia, em 1890 quando Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato descreveram a presença de substâncias “antitoxinas” no sangue que neutralizavam a acção de toxinas diftéricas e tetânicas.

Com o passar do tempo, verificou-se que essas substâncias, além de neutralizar toxinas, também reagiam frente a substâncias do próprio organismo, tal como hemácias, proteínas, etc., surgindo assim o termo antigénio. No entanto, muitas ideias ainda não eram claras, tal como o facto de não se entender como seria possível que indivíduos possuíssem tão grande diversidade de anticorpos, nunca tendo o organismo estado em contacto com os respectivos agentes estranhos. Como forma de explicar o fenómeno de reacção antigénio-anticorpo, foi estabelecida a teoria instrucionista, que tem por base na molécula de antigénio indicar a conformação do anticorpo, de forma a que este se pudesse moldar à sua estrutura e se ligar (Landsteiner K. e Springer E.D., 1933).

Após a segunda guerra mundial, o mundo científico alterou de forma acentuada as suas ideias, surgindo uma nova teoria, que contrapunha a teoria instrucionista. Niels Jerne defendia de forma clara, que os anticorpos eram produzidos pelo organismo naturalmente, existindo uma diversidade elevada destas moléculas que podiam reagir com antigénios diferentes. Em 1957, MacFarlane Burnet e David Talmage acrescentaram um dado muito importante às ideias defendidas por Niels Jerne, nascendo a teoria da “selecção clonal” que focava a origem dos anticorpos pelos linfócitos B. Estes formam uma série de clones distintos, sendo produzido por cada clone um anticorpo diferente e único, que somente reage com o antigénio específico. Posteriormente, verificou-se com estudos desenvolvidos sobre mielomas, que tumores de células plasmáticas, produzem uma elevada quantidade de anticorpos monoclonais, sendo esta descoberta crucial na produção de anticorpos e no seu estudo (Burnet F.M. e Talmage D., 1957).

Em 1926, Lloyd Felton e G. Baylen descobriram que os anticorpos apresentam natureza proteica, sendo o termo “imunoglobulina” aplicado à molécula, devido à sua natureza.

Surge ainda o conceito de anticorpo como unidade básica constituída por duas cadeias: Leves (L) e Pesadas (H). Comparando as diferentes cadeias (H e L) verificou-se que os primeiros cem aminoácidos apresentam uma composição diferente, tendo por isso o nome de “região

---

variável”, sendo a restante composição em aminoácidos idêntica entre os diferentes anticorpos, como tal foi designada de “região constante”.

Contudo, um fenómeno relevante ficava ainda por compreender, pois não era claro como seria possível que indivíduos possam desenvolver dezenas de milhões de anticorpos diferentes se o genoma Humano é constituído por um menor número de genes. Este facto foi explicado, pois verificou-se que ao contrário do que ocorre normalmente com outras proteínas, em que um gene codifica uma cadeia peptídica, os genes das Imunoglobulinas apresentam-se constituídos por um elevado número de segmentos génicos, que podem combinar-se entre si originando assim a elevada diversidade de anticorpos que existem no organismo (Hozumi, N. e Tonegwa S., 1976; Tonegwa S., 1998).

Verificou-se ainda, que tal como a região variável do anticorpo caracterizava a sua especificidade, a região constante apresentava as propriedades efectoras do anticorpo, determinando a sua classe ( $\mu, \alpha, \gamma, \delta, \epsilon$ ) (Max E.E., 1998).

A descoberta dos anticorpos e das suas capacidades para reconhecer um grande número de antígenos levou a uma expansão do seu uso em diversas áreas (exemplo: terapia antitumoral, prevenção da rejeição de transplantes, patologias auto-imunes, etc.), sendo relevante o seu uso no tratamento de diversas enfermidades, tal como a aplicação de anticorpos na imunoterapia tumoral (Kohler G. e Milstein C., 1975).

## 1.1- Características gerais dos anticorpos

Os anticorpos (Acs) ou imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas produzidas por animais vertebrados, que podem encontrar-se solúveis ou numa forma membranar. Caracterizam-se por apresentarem uma dupla funcionalidade: ligação aos antígenos (Ags) e união a imensas moléculas e células efectoras (Burnet, 1959).

Todos os anticorpos apresentam uma estrutura básica muito similar responsável pelas suas propriedades físico-químicas, sendo a sua estrutura muito semelhante a um “Y” ou um “T”, compostos por duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (cadeias H- com peso molecular entre 55 e 70 kDa, unidas entre si por duas pontes dissulfureto e duas cadeias leves com peso molecular de 24-25 kDa, idênticas, que se unem às cadeias pesadas por interações covalentes e não covalentes (Burton D.R., 1986).

Utilizando duas enzimas proteolíticas, papaína e pepsina, é possível obter fragmentos mais pequenos de anticorpos, que divergem consoante o local de digestão enzimático (figura nº1).

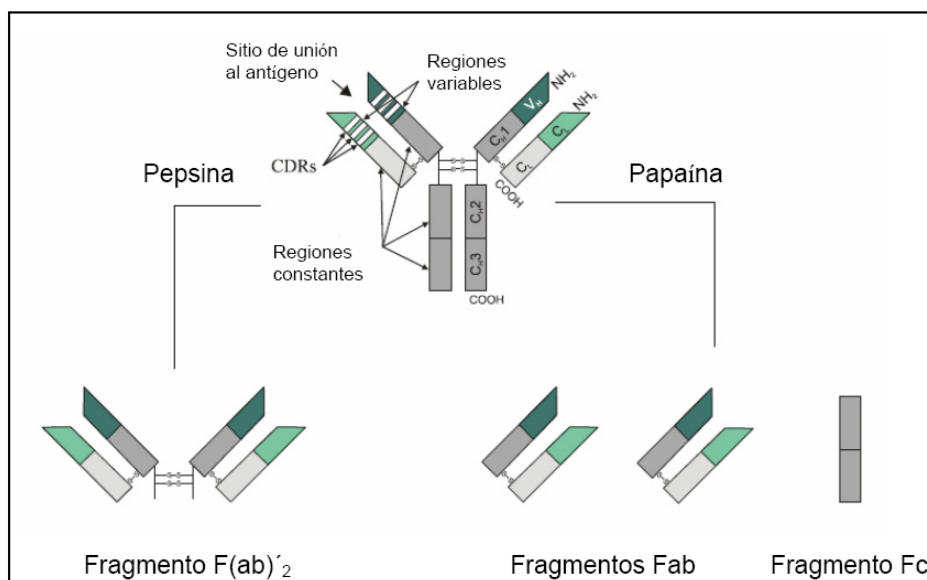


Figura nº1 – Estrutura de uma imunoglobulina e tratamento com enzimas (Winter G., 1991).

Fab- Fragmento de ligação ao antígeno (*Fragment antigen binding*);

CDR- Região determinante de complementaridade

Devido ao uso destas enzimas, verificou-se que a cadeia pesada (H) e a cadeia leve (L) encontram-se dispostas em três unidades estruturais, sendo duas destas unidades denominadas Fab (**F**ragment **a**ntigen **b**inding) e uma denominada Fc (**F**ragment **c**rystalline). A região Fab tem a capacidade de se unir ao antígeno, enquanto que a região Fc é responsável pelas funções efectoras dos anticorpos (Winter G., 1991).

Ambas as cadeias apresentam unidades repetidas ou domínios de aproximadamente 110 aminoácidos ligados por pontes dissulfureto (domínio tipo Imunoglobulina). A cadeia leve apresenta um domínio variável ( $V_L$ ) e um domínio constante ( $C_L$ ), enquanto que a cadeia pesada apresenta um domínio variável ( $V_H$ ) e três ou quatro domínios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ) dependentemente do tipo de imunoglobulinas. O domínio C-terminal da cadeia leve ( $C_k$  e  $C_\lambda$ ) da molécula de anticorpo interage com a cadeia pesada mantendo a integridade da molécula (Gall, 1968).

Se compararmos as sequências de aminoácidos dos domínios constantes podemos determinar em humanos dois tipos ou isótipos de cadeias leves. Os dois tipos de cadeia leves (kappa e lambda), bem como os cinco tipos de cadeia pesada (mu, delta, gamma, alfa e épsilon) que originam as cinco classes de imunoglobulinas conhecidas: IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE respectivamente (Tabela nº1).

**Tabela nº1 – Classes de imunoglobulinas** (Wu T.T., 2000).

| Classe     | Cadeias pesadas | Subclasses                               | Cadeia leve           | Fórmula molecular  |
|------------|-----------------|--|-----------------------|--|
| <b>IgG</b> | $\gamma$        | $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$ | $\kappa$ ou $\lambda$ | $\gamma_2 K_2 / \gamma_2 \lambda_2$                            |
| <b>IgM</b> | $\mu$           | -  | $\kappa$ ou $\lambda$ | $(\mu_2 K_2)_n / (\mu_2 \lambda_2)_n$<br>N= 1 ou 5             |
| <b>IgA</b> | $\alpha$        | $\alpha 1, \alpha 2$                     | $\kappa$ ou $\lambda$ | $(\alpha_2 K_2)_n / (\alpha_2 \lambda_2)_n$<br>N= 1, 2, 3 ou 4 |
| <b>IgE</b> | $\epsilon$      | -  | $\kappa$ ou $\lambda$ | $\epsilon_2 K_2 / \epsilon_2 \lambda_2$                        |
| <b>IgD</b> | $\delta$        | -  | $\kappa$ ou $\lambda$ | $\delta_2 K_2 / \delta_2 \lambda_2$                            |



## 1.2- Classe das imunoglobulinas

Em Humanos encontram-se definidos cinco tipos de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Estas moléculas encontram-se envolvidas em numerosas funções efectoras no organismo (tabela nº2), o que origina as suas grandes potencialidades quando aplicadas na terapias (Burton D.R., 1992).

***Tabela nº2- Funções efectoras desempenhadas pelas imunoglobulinas***

| <b>Funções<br/>efectoras</b>  |  |
|---|--|
| <b>Neutralização<br/>de agentes<br/>patogénicos e<br/>de toxinas</b>                            | A forma mais simples e rápida de actuação dos anticorpos frente a agentes patogénicos, é inibindo a sua acção, por ligação aos mesmos. Ao ocorrer a ligação dos anticorpos aos agentes patogénicos, como vírus ou bactérias, impede-se que estes se liguem às células alvo, bem como que as toxinas se liguem aos receptores celulares, não desencadeando assim a patologia.   |
| <b>Activação do<br/>sistema de<br/>complemento</b>  | Uma das funções dos anticorpos IgG e IgM é a activação pela via clássica de um sistema de proteínas plasmáticas – complemento. A activação do complemento leva à destruição das células por lise. Esta activação pode decorrer mediante a presença de anticorpos, ou na sua ausência, no caso da via clássica, a activação do complemento terá início aquando da ligação do primeiro componente da cascata (C1) à porção Fc da IgM ou IgG.   |
| <b>Opsonização<br/>e fagocitose</b>   | No caso de bactérias que se multiplicam no meio extra-celular, ou de células tumorais o anticorpo apresenta o papel de permitir que as células como neutrófilos e macrófagos fagocitem e destruam o agente patogénico. Assim, o processo de fagocitose é facilitado quando o agente patogénico fica rodeado de anticorpos, já que as células fagocíticas expressam receptores para a região Fc que activam este processo. Encontram-se descritos receptores das células fagocíticas para a região Fc dos anticorpos IgG, IgM e IgA, podendo assim estes anticorpos também intervir neste processo efector. |
| <b>Citotoxicidade<br/>mediada por<br/>células e<br/>dependendo<br/>de anticorpos<br/>(ADCC)</b> | A activação de células citotóxicas (NK, macrófagos) pode ocorrer directamente entre célula-anticorpo, quando na presença de um agente patogénico envolvido por anticorpos, a região Fc deste se liga a determinados receptores que activam a secreção de enzimas e perforinas que levam à destruição celular.  |
| <b>Morte celular<br/>directa</b>  | Alguns anticorpos apresentam a capacidade de matar a célula de forma directa, activando a apoptose celular.  |

---

Apresentando cada imunoglobulina características e funcionalidades diferentes torna-se relevante especificar cada uma das classes:

### **I- Imunoglobulina M (IgM)**

O anticorpo IgM é o principal anticorpo que actua na resposta imune primária, sendo um dos primeiros anticorpos que surge tanto nos animais vertebrados mais primitivos como no decorrer do desenvolvimento do sistema imunológico (Kuby J., 2002).

Esta imunoglobulina apresenta uma estrutura pentamérica constituída por cinco monómeros com quatro cadeias cada (duas cadeias pesadas e duas cadeias leves), proporcionando a cada molécula dez locais de reconhecimento antigénico. Mesmo sendo a estrutura pentamérica a mais comum, sabe-se que estas podem adquirir outras estruturas, tal como: estrutura hexamérica e monomérica, assim, a IgM é a imunoglobulina com maior peso molecular, sendo este de 970kDa no caso da estrutura pentamérica (figura nº.2).

Concentrações normais de IgM no soro encontram-se à volta dos 1,5mg/ml. Na sua composição encontram-se elevados níveis de carboidratos dispostos nas cadeias pesadas da molécula que actuam aumentando a solubilidade da molécula e estabilizam a sua estrutura terciária.

A estrutura pentamérica da IgM é mantida pela ligação da cadeia peptídica denominada cadeia J. A polimerização destas moléculas ocorre de forma muito rápida já que nos extremos carboxilo-terminais das cadeias pesadas encontra-se uma cisteína adicional que leva ao estabelecimento de pontes dissulfureto entre os monómeros da IgM e a cadeia J. Finalmente, outras das características da IgM pentamérica deve-se ao facto desta apresentar maior eficiência para ligar epítomos repetidos com baixa afinidade sendo ainda a IgM um dos anticorpos mais eficientes na activação do complemento pela via clássica (Burton D.R. e Wof J.M., 1992).

### **II- Imunoglobulina A (IgA)**

A imunoglobulina IgA predomina nas secreções seromucosas (leite materno, saliva, secreções traqueo-bronquias, vaginais, lágrimas, etc.). Esta molécula pode apresentar-se com diversas estruturas, nomeadamente, monómero ou dímero, consoante o local onde se encontra.

Encontram-se descritas duas subclasses das IgA, sendo as IgA1 e IgA2. A IgA1 é caracterizada por se encontrar em elevadas concentrações no soro, enquanto que a IgA2 é caracterizada por encontrar-se em maior quantidade nas mucosas.

A IgA com estrutura polimérica apresenta também uma cadeia J. No caso de uma IgA secretada nas mucosas, além da cadeia J, a IgA contém um componente secretor, o qual é adicionado durante a passagem da IgA através do epitélio mucoso (figura nº.2).

Como referido inicialmente, esta molécula encontra-se presente nas mucosas, nomeadamente no leite materno, o que proporciona uma fonte considerável de anticorpos ao recém-nascido, favorecendo uma defesa mais eficaz. Nas restantes mucosas a IgA actua

---

formando uma barreira que delimita a absorção dos antígenos solúveis, bem como, reduz a invasão pelos microrganismos. A composição das IgA em carboidratos é relativamente elevada já que apresenta cerca de 7-11% deste composto (Burton D.R. e Wof J.M., 1992).

### **III- Imunoglobulina E (IgE)**

A molécula de imunoglobulina IgE é o anticorpo menos abundante no soro, apresentando concentrações 25 a 3000 vezes menor comparativamente com as restantes imunoglobulinas, e um tempo de semi-vida no soro também muito inferior às restantes (cerca de dois dias).

Apesar da sua baixa concentração, esta imunoglobulina encontra-se ligada por longos períodos de tempo (semanas ou meses) a um receptor para Fc de elevada afinidade (FcεRI), que se encontra associado à membrana plasmática dos basófilos e dos mastócitos. Na presença de um estímulo (ligação de um antígeno ao complexo IgE/ FcεRI), desenvolve-se uma reacção violenta, com libertação de histamina e outras aminas com função vasoactivas, que caracterizam o quadro clínico de alergia. A IgE caracteriza-se assim por ser responsável pela eliminação de parasitas, e por ser responsável por processos de alergias e anafilaxia (Hipersensibilidade tipo I).

A IgE apresenta um peso molecular de 188kDa, sendo o seu conteúdo em carboidratos cerca de 12%, encontrando-se estes ligados aos três primeiros domínios constantes da cadeia pesada (Burton D.R. e Wof J.M., 1992).

### **IV- Imunoglobulina D (IgD)**

A imunoglobulina IgD representa menos de 1% das imunoglobulinas plasmáticas, sendo a sua função ainda pouco conhecida, no entanto, sabe-se que esta molécula é um monómero que apresenta um peso molecular de cerca de 184kDa, rica em carboidratos (9-14%) e oligossacarídeos, desempenhando um papel importante na diferenciação dos linfócitos, sendo um dos principais receptores para antígenos na superfície dos linfócitos B virgens ou naive, que ainda não entraram em contacto com o antígeno (Kuby J., 2002).

A vida média desta molécula é muito curta (cerca de 2,8 dias), não sendo secretada pelos linfócitos B numa situação normal (Burton D.R. e Wof J.M., 1992).

### **V- Imunoglobulina G (IgG)**

A IgG é o principal anticorpo de resposta secundária, apresentando uma estrutura monomérica, com duas cadeias pesadas e duas leves, e um peso molecular de 150kDa (figura nº.2). A concentração desta imunoglobulina no soro de mamíferos é consideravelmente elevada, representando cerca de 75% do total de imunoglobulinas circulantes, bem como na linfa e fluídos peritoneais. A IgG é muito estável no soro, apresentando um tempo de semi-vida prolongado, cerca de três semanas.

Em Humanos, podem ser classificadas 4 subclasses de IgG, sendo estas a IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, sendo a IgG1 a imunoglobulina que se apresenta em maior concentração.

Os domínios constantes destas imunoglobulinas apresentam uma percentagem muito elevada de semelhanças (95%). No entanto, as diferenças que levam à determinação destas quatro subclasses são o tamanho da região da charneira, e o número e posição das ligações dissulfureto entre as cadeias pesadas. Consequentemente, as diferenças verificadas nas diferentes subclasses de IgG afectam a funcionalidade das moléculas, o que justifica a maior capacidade da IgG1 em atravessar a placenta, desenvolvendo um papel muito importante na protecção do feto. Por outro lado, a IgG3 e IgG1, apresentam elevada eficiência na activação do complemento. Outra característica importante, é a capacidade da IgG1 e IgG3 se ligarem com elevada afinidade aos receptores Fc de células fagocíticas, mediando a opsonização, enquanto que a IgG4 e a IgG2 tem afinidade muito baixa. Esta molécula apresenta um peso molecular de 150kDa e uma concentração no soro de cerca de 10mg/ml, apresentando níveis muito baixos nas secreções (Burton D.R e Wof J.M., 1992).

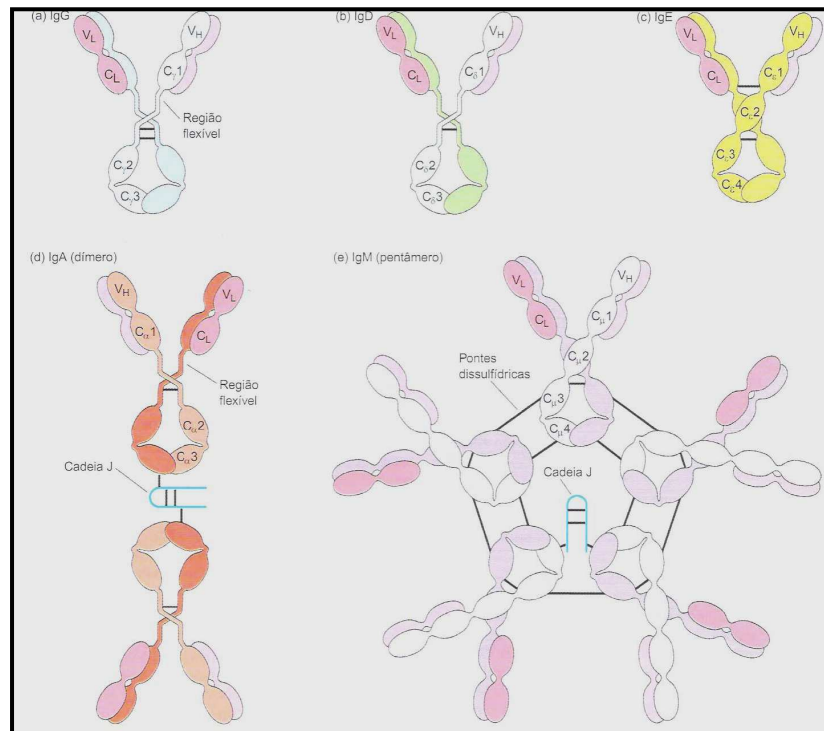


Figura nº 2 – Estrutura das diferentes classes de imunoglobulinas (Kuby J., 2002).

---

### 1.3- Origem da diversidade dos anticorpos

O sistema imune apresenta uma enorme capacidade para reconhecer e produzir anticorpos específicos frente a diversas substâncias estranhas ao organismo. Sendo este mecanismo característico deste sistema (Landsteiner K., 1946).

O mecanismo de formação desta variabilidade de anticorpos tem vindo a despertar, ao longo dos anos, grande interesse, tendo surgido uma primeira teoria que sugeria que as imunoglobulinas apresentam sequências genéticas diferentes para codificar as regiões variáveis e constantes (Dreyer W.J., 1965). Verificou-se a presença no DNA de segmentos génicos (V, D, J) que codificavam para a região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas, e dois segmentos (V, J) para a cadeia leve, que numa fase germinal se encontram distantes, no genoma, enquanto que após formação dos linfócitos B se apresentam próximos, ocorrendo um processo de reorganização do genoma (Tonegawa S., 1976, 1983).

#### 1.3.1- Genética da cadeia pesada (H)

Em humanos, o *locus* codificante para a cadeia pesada apresenta 51 genes  $V_H$  funcionais, intercalados por genes não funcionais, situados no cromossoma 14, com cerca de 1,5Mb (Matsuda F. et al., 1993) Na extremidade do gene  $V_H$ , encontram-se presentes trinta segmentos  $D_H$ , seis  $J_H$  e nove genes codificantes de uma das regiões constantes da cadeia pesada ( $\mu, \delta, \gamma 3, \gamma 1, \alpha 1, \gamma 2, \gamma 4, \epsilon, \alpha 2$ ).

#### 1.3.2- Genética da cadeia leve (L)

As imunoglobulinas podem ser constituídas por um dos dois tipos de cadeias leves, cadeia kappa ( $\kappa$ ) e cadeia lambda ( $\lambda$ ) codificadas no cromossoma 2 e 22 respectivamente. O *locus* codificante para cadeia  $\kappa$  tem um tamanho de 3Mb e apresenta cerca de 85 segmentos  $V_\kappa$ , sendo apenas 50 funcionais, localizados na extremidade 5' do grupo de segmentos  $J_\kappa$  e próximos de um gene codificante para a região constante (Ermer K. et al., 1995). Os genes codificantes para esta cadeia não apresentam segmentos D.

Relativamente à cadeia  $\lambda$ , esta apresenta um tamanho de cerca de 1,1Mb, formada por 52 genes  $V_\lambda$ , sendo cerca de metade não funcionais (Frippiat J.P. et al., 1995). Na extremidade 5' verifica-se a presença de sete segmentos constantes associados a segmentos J. Os genes codificantes para esta cadeia também não apresentam segmentos D.

### 1.3.3- Reorganização génica das Imunoglobulinas

Para ocorrer a formação de imunoglobulinas, durante o processo de desenvolvimento e maturação dos linfócitos B, ocorre uma reorganização génica tanto no *locus* da cadeia pesada como no *locus* da cadeia leve de modo a garantir a variabilidade e diversidade das Igs.

Inicialmente ocorre a união dos fragmentos  $D_H$  com os fragmentos  $J_H$ , formando-se fragmentos  $D_HJ_H$ . De seguida ocorre a união do fragmento  $D_HJ_H$ , com os fragmentos  $V_H$  (Tonegawa S., 1974, 1983). Posteriormente ocorre a união dos segmentos VJ da cadeia leve. O resultado desta reorganização dos genes variáveis é a formação de um linfócito B imunocompetente capaz de produzir anticorpos de uma determinada especificidade antigénica. (Fugmann S.D. et al., 2000). O mecanismo de exclusão alélica que ocorre na formação das imunoglobulinas impede a formação de diferentes tipos de cadeias leves e pesadas num mesmo anticorpo (Coleclough C., 1981). No caso de não ocorrer a formação de uma imunoglobulina funcional na membrana do linfócito B ocorre a morte da célula.

A grande diversidade de anticorpos existentes, independentemente do contacto com antígenos estranhos ao organismo, ocorre devido a diversos mecanismos:

- Combinação de cadeias pesadas com cadeias leves;
- Eliminação de nucleótidos dos extremos de união V, D e J por exonucleasas celulares;
- Diferente número de genes nos indivíduos que codificam para as regiões V, D e J;
- Combinações diferentes das regiões V, D e J;
- Adição de nucleótidos nas uniões dos fragmentos após recombinação;
- Ocorrência da tradução em diferentes zonas de leitura.

Após contacto com antígenos estranhos, existe um mecanismo importante responsável pelo aumento da diversidade dos anticorpos, denominado de Hipermutação somática que ocorre em alguns genes V já reorganizados (Milstein, 1986,1991).

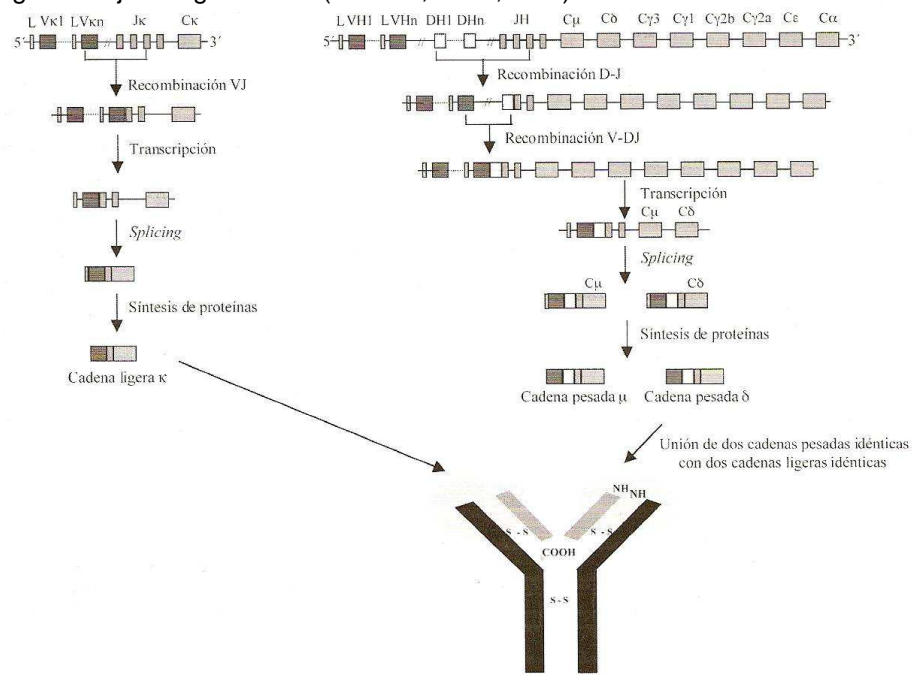


Figura nº3 – Representação esquemática da reorganização dos segmentos génicos  $V_{\kappa}J_{\kappa}$  e  $V_HD_HJ_H$  para formar um gene funcional que codifica a cadeia leve e pesada de uma imunoglobulina (Max E.E., 1998).

---

## 1.4- Dos anticorpos séricos aos anticorpos monoclonais

A produção de anticorpos solúveis pela activação dos linfócitos B é o principal mecanismo de defesa dos animais vertebrados, sendo descritos como moléculas capazes de neutralizar ou eliminar agentes patogénicos daí Paul Ehrlich os ter designado de “Balas Mágicas” (Witkop B., 1999). Perante este facto, o estudo do uso dos anticorpos em terapia tem apresentado imensos avanços, para demonstrar a sua eficácia frente a diversas patologias, tal como infecções, tumores, ou doenças auto-imunes (William E.P., 1999).

Inicialmente o uso de anticorpos na terapia, não passava da utilização de anti - soros ou soros imunes convencionais, sendo estes obtidos de diversos animais, incluindo o Homem, após imunizações repetidas com determinados agentes, tal como, proteínas, células, agentes patogénicos, toxinas, etc. No entanto, o soro imune contém anticorpos produzidos por diferentes clones de linfócitos B pelo que estes apresentam a capacidade de reconhecer o antígeno imunizante, no entanto, a sua especificidade e afinidade revela-se diferente, sendo assim, este tipo de soro são denominados como soros policlonais.

Verifica-se assim que o uso de anticorpos policlonais gera uma série de problemas, no que diz respeito à sua variabilidade, e consequentemente diferente especificidade e afinidade frente ao antígeno pretendido, bem como a limitação decorrente da quantidade de soro que se pode obter (Kohler G. e Milstein C., 1975).

Perante estes factores verificou-se a necessidade de produzir de forma ilimitada anticorpos com a mesma especificidade e afinidade, sendo desenvolvida a técnica de produção de anticorpos Monoclonais.

Os anticorpos Monoclonais (AcMos) diferem dos policlonais, sendo estes produzidos a partir de apenas um clone de linfócitos B, consequentemente demonstram-se homogéneos, sendo desta forma muito mais eficazes que os Anticorpos policlonais. O desenvolvimento da técnica de produção do AcMos teve como autor o Dr. César Milstein e George Kohler em 1975, tendo sido galardoados com o prémio Nobel de Medicina e/ou Fisiologia em 1984.

Com o uso desta técnica é possível formar anticorpos específicos a partir de um único clone imortal de células B. A criação deste clone decorre da fusão celular “in vitro” de linfócitos B produtores do anticorpo de interesse com células B tumorais (mieloma- Figura nº4), obtendo-se uma célula híbrida (Híbridoma) que tem como característica a imortalidade e a secreção contínua do anticorpo pretendido. Sendo o anticorpo produzido por apenas um único clone de células secretoras é denominado por “Anticorpo Monoclonal”, ostentando como característica principal a presença de uma elevada especificidade frente a um antígeno concreto, bem como elevada afinidade, sendo possível obter-se uma quantidade de anticorpo ilimitada (Kohler G. e Milstein C., 1975).

Desde o desenvolvimento inicial da técnica a produção de anticorpos monoclonais tem vindo a aumentar, sendo a sua aplicação vasta e muito útil no diagnóstico e tratamento de diversas patologias (Berger M. et al., 2002).

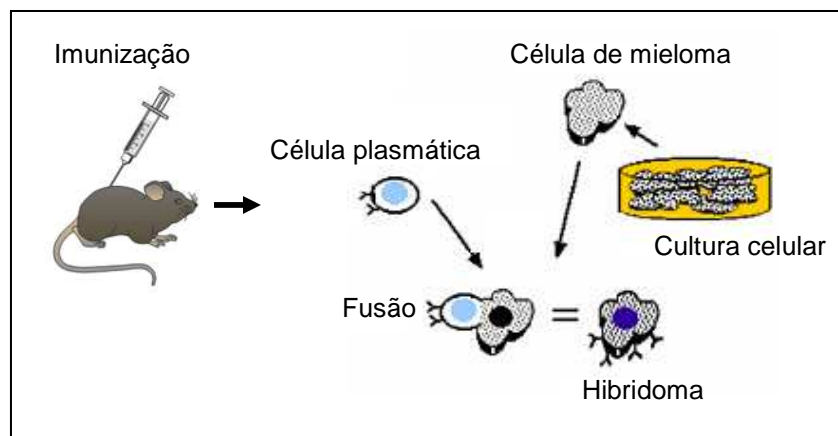


Figura nº4 – Obtenção de hibridomas para produção de anticorpos monoclonais.

#### 1.4.1- Produção de Anticorpos Monoclonais

O processo utilizado na produção de anticorpos monoclonais não sofreu grandes modificações (figura nº5). Inicialmente efectua-se várias imunizações num determinado animal (o animal mais utilizado neste processo são os ratos) usando um antígeno específico, induzindo assim a activação da resposta imunitária com consequente produção de linfócitos B específicos contra o agente imunizante. As várias imunizações aplicadas ao animal levam a uma resposta imunológica mais eficaz e específica, levando à activação acentuada do sistema imune com maior resposta na produção de linfócitos B de interesse.

Geralmente os linfócitos B são obtidos a partir do baço do animal após uma imunização intra-venosa, no entanto, estes também podem ser adquiridos através dos gânglios ou mesmo de sangue periférico. Para potenciar a activação do sistema imune na formação de linfócitos B produtores de anticorpos específicos podem ser utilizados alguns adjuvantes, nomeadamente toxinas, bactérias inactivadas (etc.) (Rudbach J.A. et al, 1995).

Os linfócitos B obtidos após imunização devem sofrer um processo para se tornarem imortais. Para tal, deve ocorrer a fusão dos linfócitos B obtidos após imunização com linfócitos B tumorais (mieloma), já que esta célula apresenta todas as características para secretar anticorpos, sendo geralmente utilizada uma linha tumoral produzida por Michael Potter nos anos sessenta, designada por NSO ou Sp2/0 (não produz anticorpos endógenos) (Potter M. e Boyce C., 1962).

De modo a seleccionar os hibridomas secretores de anticorpos com a especificidade desejada, testam-se as células (tumorais, linfócitos B e células tumorais fundidas com linfócitos B) relativamente à síntese de nucleótidos, testando as duas vias de geração de nucleótidos (via “de novo” e via da salvação). As células tumorais são caracterizadas por somente apresentarem a



via “de novo” como via de formação de nucleótidos, enquanto que os linfócitos apresentam a via “de novo” e a via da salvação para formarem os nucleótidos. Como tal, colocaram-se as células em presença de aminopterina, hepoxantina e timidina, apresentando a aminopterina a capacidade de bloquear a síntese de novo, consequentemente as células tumorais que apenas utilizam esta via para formar os nucleótidos, são eliminadas, enquanto que os linfócitos B, mesmo apresentando a capacidade de formar nucleótidos utilizando a via da salvação, estes morrem naturalmente, já que apresentam um tempo de semi-vida reduzido. Como tal, apenas as células em que ocorreu a fusão dos linfócitos B com as células tumorais se mantêm vivas, já que a imortalidade das células B é proporcionada devido à fusão com as células tumorais (caracterizadas por células imortais), bem como a síntese de nucleótidos pode decorrer, já que os linfócitos B apresentam a via da salvação (Yoo E.M. et al, 2002).

Além de verificar a presença de linfócitos B não fundidos, é necessário verificar a especificidade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas relativamente ao antigénio de interesse. Para tal são aplicadas algumas técnicas, de modo a verificar a especificidade dos anticorpos produzidos, nomeadamente ELISA, Imunofluorescência, Western-Blot, etc., sendo somente seleccionados os hibridomas cuja especificidade e afinidade é mais elevada frente ao anticorpo de interesse.

Por fim, é necessário que cada hibridoma se individualize e se replique formando células filhas idênticas à células mãe, e portanto verificar a capacidade de produção apenas do anticorpo desejado, podendo efectuar-se este processo através da execução de uma série de diluições seriadas, até somente se chegar a uma única célula (que posteriormente se divide e origina os clones), ou ainda por sementeira em agar.

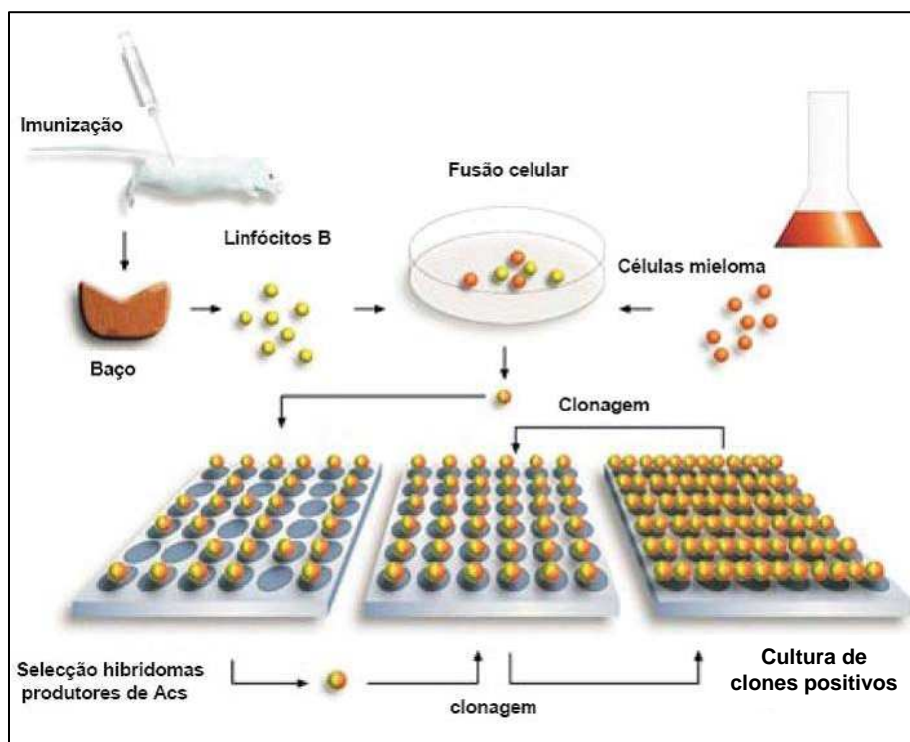


Figura nº5 – Selecção e cultura de Hibridomas (Papkoff J., 2007).

---

A conservação dos hibridomas pode ser efectuada utilizando-se um criopreservante, tal como, Dimetilsufóxido (DMSO) que os conserva sob uma forma congelada durante anos.

Como forma de obter níveis elevados de anticorpos é possível utilizar-se sistemas de cultivo “in vitro” que permitem manter elevadas concentrações celulares em pouco volume de meio, ou ainda, efectuar a indução de ascites em animais (ratos), injectando intraperitonealmente hibridomas, para que estes cresçam e libertem os anticorpos na cavidade intraperitoneal, tendo em atenção que em alguns países este procedimento encontra-se proibido (Yoo E.M. et al, 2002).

#### **1.4.2- Evolução dos Anticorpos Monoclonais**

Os anticorpos monoclonais obtidos através dos ratos promoveram um grande avanço no desenvolvimento de técnicas de detecção, vendo-se a sua utilidade na terapia humana bloqueada ao observar-se respostas de rejeição pelos indivíduos, nomeadamente no desenvolvimento de alergias, respostas anafiláticas, ou mesmo na diminuição da eficácia do seu uso. Verificou-se ainda que a região Fc destes anticorpos de rato interage deficientemente com os mecanismos efectores do hospedeiro (sistema complemento, receptores Fc que activam a fagocitose, etc.) originando uma resposta diminuída, bem como a produção de anticorpos anti-rato (*human anti-mouse antibody* – HAMA), principal oposição do uso dos anticorpos monoclonais.

De forma a contornar a ineficácia dos anticorpos monoclonais de rato e devido ao desenvolvimento da Biologia Molecular foram concebidos novas formas de produção de anticorpos, nomeadamente: Quiméricos, apresentando estes apenas fragmentos de anticorpos de rato, ao invés do anticorpo inteiro, de forma a minimizar os riscos de rejeição. Assim é mantida a região variável de rato, conservando a especificidade de ligação ao antigénio, no entanto, a região Fc de rato foi eliminada diminuindo a imunogenicidade do anticorpo.

No entanto, com o uso destes anticorpos, verificou-se que ocorriam respostas de rejeição (HACA), tornando ineficiente o seu uso.

Deste modo, a única forma de contornar a ineficiência destes anticorpos recaía na obtenção de anticorpos totalmente humanos, no entanto, essa perspectiva apresentava muitos obstáculos já que a obtenção de hibridomas humanos apresenta imensas dificuldades, tal como, a obtenção de um baixo número de anticorpos formados a partir dos linfócitos B imortalizados pelo vírus Epstein Barr, ou ainda a inexistência de um mieloma Humano estável tornavam a obtenção destes anticorpos impossível, bem como o facto de não ser passível a indução directa de hibridomas no Homem devido ao prejuízo para a sua saúde, não sendo mesmo viável a nível ético.

Os enormes avanços ocorridos na área da Biologia Molecular levaram à formação de anticorpos recombinantes, através do uso de técnicas de DNA recombinante, que consistiam em manipular geneticamente os genes responsáveis pela produção dos anticorpos de rato

---

pretendidos, tornando a sua estrutura em aminoácidos muito próxima da estrutura de aminoácidos Humana, mantendo, no entanto, a especificidade do anticorpo. Assim, estes anticorpos ultrapassavam as dificuldades incrementadas pelos anticorpos de primeira geração (anticorpos de rato), tornando-se invisíveis ao sistema imune.

Os anticorpos recombinantes, também designados por anticorpos de segunda geração são criados pela “imortalidade dos genes” produtores da imunoglobulina, ao invés de serem produzidos pela imortalidade da célula produtora dos anticorpos. Através das técnicas de DNA recombinante é possível incluir um carácter Humano aos anticorpos de rato, por alteração dos genes codificadores das cadeias de imunoglobulina alterando assim, a estrutura e função destes anticorpos (Gorman S.D. e Clark M.R, 1990).

Estas técnicas permitem obter tanto anticorpos completos, como apenas fragmentos destes anticorpos. Os anticorpos completos apresentam tanto a região Fab como a região Fc podendo ser distinguidos consoante a sua composição como: Humanizados, Quiméricos e Primatizados. Para identificar a origem do anticorpo foi proposta a seguinte nomenclatura:

. Terminação: -momab (origem de rato); -ximab (anticorpo quimérico); -zumab (anticorpo Humanizado).

#### ***A- Anticorpo Quimérico***

Os anticorpos Quiméricos são obtidos através de técnicas de DNA recombinantes, proporcionando ao anticorpo a combinação de regiões humanas e de rato (a porção constante das cadeias leves e pesadas é obtida através de uma imunoglobulina Humana; as regiões variáveis  $V_H$  e  $V_L$  são obtidas através de anticorpos monoclonais de rato), apresentando estes anticorpos um tempo de semi-vida de cerca de 4 a 15 dias. Ou seja, os genes que codificam a região variável das imunoglobulinas de rato unem-se com genes que codificam a região constante Humana, sendo posteriormente transfectados com células de mieloma, produzindo novas moléculas de anticorpos constituídas por regiões de rato e regiões Humanas. A combinação de regiões Humanas com regiões de Rato pretende diminuir a imunogenicidade provocada pelos anticorpos de 1º geração, atenuando a resposta HAMA.

A denominação de anticorpo Quimérico foi atribuída alusivamente ao monstro mitológico “Químera” que foi gerado pela união de Tifón e Equidna, sendo composto por uma cabeça de leão, corpo de cabra e cauda de serpente.

Alguns anticorpos quiméricos já apresentam a sua eficácia clínica comprovada e aceite pela FDA, nomeadamente: Abciximab, Rituximab e Infliximab (Bruggemann M. et al, 1989).

---

### **B- Anticorpos Humanizados**

Após a descoberta dos anticorpos quiméricos que vieram diminuir a resposta HAMA, verificou-se a necessidade de formar anticorpos ainda mais humanizados, uma vez que foi verificada a presença de resposta HACA (*human anti-chimeric antibodies*) contra os anticorpos quiméricos.

Em 1986, graças à engenharia de proteínas, surgiram anticorpos Humanizados, que apresentavam uma imunogenicidade muito menor que os anticorpos quiméricos, bem como um tempo de semi-vida superior (cerca de 3-24 dias). Os anticorpos Humanizados apresentam cerca de 90-95% da sua estrutura Humana, sendo apenas 5-10% da estrutura pertencente a anticorpo de rato. A obtenção de anticorpos Humanizados ocorre através do transplante das regiões hipervariáveis (CDR) de um anticorpo de rato, nas região variável de um anticorpo Humano, formando-se um anticorpo que apresente a região variável híbrida (Humana-rato), sendo a restante estrutura do anticorpo formada apenas por regiões Humanas (Winter G., 1993).

Verificou-se que em consequência da alteração das regiões hipervariáveis dos anticorpos Humanos, por regiões hipervariáveis de anticorpos de origem de rato a afinidade dos anticorpos pelos antígenos específicos diminuía. Tal como o objectivo principal da formação destes anticorpos, que recaia no facto destes anticorpos baixarem a imunogenicidade provocada pelos anticorpos quiméricos, não era completamente verificado já que foram observadas respostas de anticorpos anti – imunoglobulinas Humanizadas – HAHA (*Human Anti-Humanized Antibodies*), tornando a utilização destes anticorpos não tão vantajosa como o pretendido.

No entanto, encontra-se descrito um elevado número de anticorpos Humanizados comercializados, nomeadamente: Daclizumab, Trastuzumab, etc. (Glennie M.J., Jonhson P.W., 2000).

### **C- Anticorpo Primatizado**

No sentido da elaboração de um anticorpo com igual afinidade contra os antígenos específicos, e menor imunogenicidade que os anticorpos Quiméricos e Humanizados foram desenvolvidos os anticorpos Primatizados. Estes são formados por regiões variáveis com origem da *Macaca fascicularis*, que apresentam estrutura muito idêntica à estrutura das regiões variáveis Humanas, mantendo-se a região constante Humana.

Encontram-se descritos vários anticorpos Primatizados, tais como: Keliximab, lumiliximab, etc.

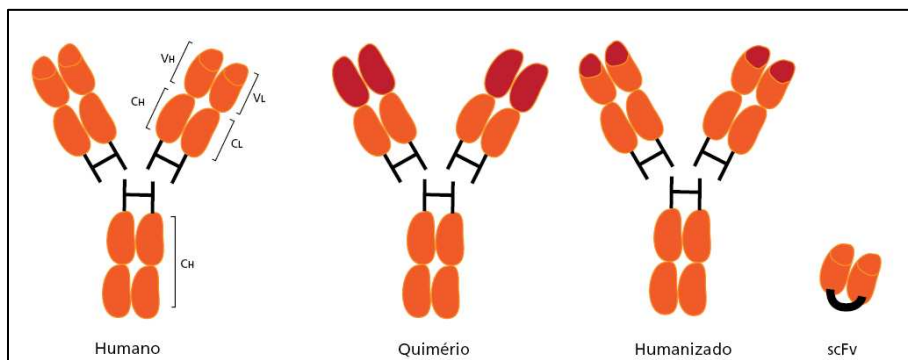


Figura nº6- Estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana, consistente em duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), ligadas por pontes dissulfureto, Apresentação das respectivas regiões variáveis (V) e constantes (C). Também é mostrado um desenho comparativo de anticorpos quiméricos, humanizados e scFv. As sequências humanas são representadas com coloração laranja, sendo as sequências de rato representadas com coloração vermelha (Sharkey R.M. e Goldenberg, D.M. 2006).

#### ***D- Moléculas derivadas de anticorpos***

O uso de anticorpos completos na terapia oferece uma série de desvantagens (exemplo: velocidade de penetração num tumor sólido demasiado lento) como tal, desenvolveram-se moléculas derivadas de anticorpos, que apresentam um tamanho muito inferior aos anticorpos inteiros (12-50 kDa) mantendo uma elevada especificidade frente aos antígenos de interesse, e apresentando vantagens relativamente ao uso de anticorpos completos (Jain R.K., 1987).

Este processo foi possível, já que a estrutura dos domínios da molécula de anticorpo é particularmente acessível à engenharia de proteínas. As moléculas derivadas de anticorpos podem ser marcadas com radioisótopos ou outro tipo de marcadores possibilitando localizar o antígeno alvo. Estas moléculas são caracterizadas, ainda, por apresentarem um potencial farmacêutico muito elevado, pois apresentam elevada capacidade de penetração e difusão nos tecidos, ao contrário dos anticorpos completos. Assim, a molécula de anticorpo pode ser fragmentada em diferentes fracções que podem ser usadas em diferentes abordagens: fragmentos de anticorpos, Diabodies, Triabodies, Anticorpos biespecíficos, Minibodies (Hoogenboon, 1992).

#### ***E- Fragmentos de anticorpos***

Os fragmentos de anticorpos podem ser constituídos por dois tipos de regiões de ligação ao antígeno: Fv e Fab, apresentando estas regiões uma vantagem muito relevante relativamente ao uso de anticorpos inteiros, já que estas regiões apresentam uma velocidade de penetração

---

dentro de um tumor sólido muito mais eficaz (16 horas/mm) que um anticorpo inteiro (54 horas/mm) (Jain R.K., 1987).

#### ***F- Single Chain (scFv)***

O desenvolvimento de moléculas derivadas de anticorpos ocorreu devido ao uso de fagos através dos quais foi possível construir livrarias gênicas de regiões variáveis de imunoglobulinas Humanas possibilitando a formação de scFv (*single chain fragment variable*) ou regiões de ligação ao antígeno.

Os fragmentos scFv apresentam uma característica importante, já que a formação de uma versão de um fragmento Fv, no qual os domínios  $V_H$  e  $V_L$  se encontram ligados por um “linker” (peptídeo com cerca de 15 aminoácidos) possibilita a formação de um fragmento Fv funcional, pois o “linker” oferece a longitude e flexibilidade necessária para permitir a organização espacial necessária aos domínios  $V_H$  e  $V_L$ , sendo mais estáveis que o domínio Fv convencional. Por outro lado, os fragmentos scFv apresentam a vantagem de serem eliminados muito rapidamente via renal, devido ao seu tamanho pequeno (25 kDa) (Bird R.E, et al., 1988).

#### ***G- Diabodies, triabodies e anticorpos biespecíficos***

O desenvolvimento de diabodies, triabodies, e anticorpos biespecíficos ocorreu devido a diversas limitações no uso dos fragmentos Fab ou scFv, já que estes fragmentos apresentam apenas uma região de ligação ao antígeno (monovalentes) tendo o seu uso limitado uma vez que apresentam baixa afinidade de ligação (Brennan M. et al., 1985, Glennie M.J. et al., 1987).

O desenvolvimento de uma molécula que apresenta duas regiões scFv, apresentando cada uma, um “linker” menor, origina um dímero, o qual apresenta duas regiões de ligação ao antígeno. Quando o dímero scFv apresenta a mesma especificidade nos domínios  $V_H$  e  $V_L$ , o produto obtido é um homodímero bivalente denominado de Diabody. Utilizando a mesma técnica é possível construir uma molécula que apresente especificidades diferentes, desenvolvendo-se anticorpos biespecíficos (Holliger, 1993).

Os Triabodies são formados quando o polipeptídeo que serve de “linker” entre os domínios scFv é eliminado completamente, sendo as duas regiões expressas como um polipeptídeo contínuo, apresentando três regiões scFv, o que forma um trímero funcional, com capacidade de união a três antígenos (Kortt A.A, 1997).

#### ***H- Minibodies***

As moléculas Minibodies são formadas por 61 resíduos de aminoácidos, sendo a sua estrutura baseada no domínio V das imunoglobulinas. A conformação espacial destas moléculas é representada como folha beta com duas asas, que correspondem a regiões hipervariáveis de ligação ao antígeno (Martin F. et al., 1994).

---

### 1.4.3 – Anticorpos Monoclonais Totalmente Humanos

A obtenção de anticorpos Monoclonais totalmente Humanos era o objectivo a atingir de forma a anular qualquer tipo de rejeição da molécula pelos pacientes, sendo a tecnologia de Hibridomas Humanos fundamental. No entanto, a produção de anticorpos totalmente Humanos utilizando esta tecnologia foi bastante problemática já que as linhas celulares derivadas de mielomas, bem como os hibridomas são difíceis de desenvolver, e o facto da imunização “in vivo” de Humanos não ser um processo ético é por isso impossível de executar.

Estes obstáculos podem ser contornados, pela utilização de técnicas capazes de produzirem anticorpos monoclonais Humanos. No entanto, a produção destes anticorpos somente teve resultado devido ao grande avanço da biologia molecular e da técnica de micro-injecção e manipulação de células embrionárias, através das quais foi possível obter ratos transgénicos portadores de genes para produção de imunoglobulinas Humanas.

Os ratos transgénicos possuem genes que apresentam como repertório maioritário o gene V Humano da linha germinal, responsável pela formação da população de linfócitos B e formação de um diverso repertório imune primário, secretando anticorpos humanos. Os ratos transgénicos podem ser imunizados com qualquer antigénio (inclusive células tumorais humanas), podendo utilizar-se os seus baços para obtenção de hibridomas mediante o protocolo convencional (descrito anteriormente). No entanto, os ratos transgénicos podem formar anticorpos que apresentem menor afinidade, já que podem ocorrer mutações nos genes das imunoglobulinas humanas.

Encontram-se descritos diversos vectores capazes de efectuarem a introdução de *loci* das imunoglobulinas humanas nos ratos, para posterior geração de espécies de ratos produtores de anticorpos humanos, tais como: miniloci, cromossomas artificiais de leveduras (YACs) e humanos (HACs), e vectores P1<sup>16</sup> (tabela nº3) (Kitamura D. et al., 1991).

**Tabela nº 3- Vectores utilizados na introdução de locis das imunoglobulinas humanas nos genes de rato (Kitamura D. et al., 1991).**

| Vectores                | Características  |
|-------------------------|--|
| Miniloci                | Vectores de pequeno tamanho que somente acolhem um número limitado de segmentos génicos.   |
| Cromossomas artificiais | Utilizados para manipular grandes segmentos génicos (< 1Mb). Os YACs são vectores sintéticos constituídos por: um centrómero e dois telómeros. |
| P1 <sup>16</sup>        | Vectores derivados de bacteriófagos que podem apresentar cerca de 100Kb de ADN, introduzidos na bactéria <i>Escherichia coli</i> .             |

---

De modo a inactivar os genes de imunoglobulinas endógenos, cruzam-se ratos transgénicos com ratos aos quais foram eliminados os genes de imunoglobulinas endógenos.

Os ratos transgénicos permitem assim obter anticorpos completamente humanos com elevada afinidade, dirigidos frente a qualquer alvo (células, citoquinas, receptores humanos, etc.) num curto período de tempo utilizando a técnica convencional de geração de anticorpos monoclonais (Bruggeman M., 1989; Magadán S. et al., 2002).

#### **1.4.4- Aplicações Gerais dos Anticorpos Monoclonais**

Devido às diversas características que os anticorpos Monoclonais oferecem, tal como a sua elevada especificidade e afinidade perante diversas moléculas, estas estruturas tornam-se importantes ferramentas de aplicação em áreas de investigação biomédica e na clínica. A sua potencial utilização na terapia humana tem apresentado um acréscimo acentuado nos últimos anos, sendo utilizados com fins variados, tais como: patologias auto-imunes, na prevenção da rejeição de transplantes, enfarte do miocárdio, cancro, etc. (Berger M. et al., 2002).

Relativamente à imunoterapia tumoral, os anticorpos monoclonais são dirigidos de forma específica contra componentes expressos nas células tumorais, ou agem de forma indirecta de modo a alterar a divisão celular, induzir morte das células tumorais por apoptose, potenciar a resposta imunitária, alterar a formação de vasos sanguíneos, etc. A utilização dos anticorpos monoclonais apresenta assim uma série de vantagens relativamente aos anticorpos de rato, quiméricos, ou humanizados, nomeadamente a diminuição de rejeição pelos pacientes e melhor capacidade em activar os mecanismos efectores (fagocitose, citotoxicidade, e activação do complemento) pelo sistema imune (Green L.L., 1991). Estes podem actuar de diversas formas (Berger M., 2002 e Casadevall A., 1996):

- Detecção e quantificação da expressão de genes;
- Determinação da localização da expressão de genes, tanto a nível celular, como subcelular e nos tecidos;
- Identificação das interacções moleculares com os produtos dos genes, por exemplo, imunoprecipitação;
- Identificação de marcas fenotípicas únicas de um tipo celular particular;
- Imunodiagnóstico;
- Diagnóstico e tratamento de tumores específicos: detecção de tumores específicos mediante técnicas imunológicas de diagnóstico e na imunoterapia de tumores “in vivo”;
- Análise funcional de moléculas de superfície celular ou de proteínas secretoras;
- Investigação imunológica, estimulando ou inibindo funções celulares particulares.



#### 1.4.5- Anticorpos Monoclonais na terapia anti – tumoral

As doenças oncológicas têm vindo a aumentar a sua taxa, apresentando consequentemente um impacto muito importante na sociedade, já que a população cada vez mais cedo se confronta com esta patologia. No entanto, a procura de soluções e terapias para combater esta enfermidade tem sido incansável, não obtendo infelizmente resultados muito satisfatórios, já que muitas das terapias utilizadas na actualidade são muito gerais, tornando-se agressivas para os doentes, uma vez que não são específicas contra as células cancerígenas (radioterapia, quimioterapia, etc.) (Blattman J.N. e Greenberg P.D., 2004).

De forma a combater a inespecificidade da actuação das terapias anti-tumorais até então utilizadas, têm sido alvo de estudo a aplicação de terapias específicas que têm como finalidade a mobilização e estimulação de células que medeiam as respostas imunes específicas anti-tumorais tal como a utilização de anticorpos anti-tumorais.

A imunoterapia tumoral tem por objectivo a utilização de componentes do sistema imune como forma de eliminar ou neutralizar células tumorais ou agentes que propiciem a proliferação do tumor. A evidência que os anticorpos são capazes de neutralizar e eliminar agentes patogénicos presentes no soro originou uma revolução nos estudos destas molécula de modo a verificar o seu potencial uso na terapia frente a infecções, tumores, transplantes, patologias auto-imunes, assim como no processo de diagnóstico de diversas patologias (Casadevall A., 1996). A primeira evidência que comprova que a utilização de anticorpos pode levar a grandes avanços terapêuticos frente a doenças cancerígenas decorreu em 1982, quando um doente com linfoma apresentou uma clara resposta ao tratamento com anticorpos monoclonais de rato (Piccaluga P. et al., 2006).

Encontram-se comercializados um elevado número de anticorpos monoclonais utilizados com fins terapêuticos, ou no diagnóstico “in vivo” (tabela nº4).

***Tabela nº4 – Anticorpos monoclonais utilizados na terapia, suas aplicações e registo efectuado pela FDA (Food and Drug Administration) ou EMEA (European Medicines Agency).***

| <b>Produto</b>              | <b>Companhia</b>                  | <b>Aplicações</b>   | <b>Registado pela FDA e/ou EMEA</b> |
|-----------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|
| Orthoclone OKT3 (Muromonab) | Ortho Biotech (Johnson & Johnson) | Anticorpo IgG2a de rato que se liga à molécula CD3 humana. Utilizado no tratamento de transplantes.   | FDA: 19 de Junho de 1986            |
| Abciximab (ReoPro)          | Centocor B.V.                     | Fragmento Fab do Ac Quimérico 7E3 e receptor da glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas humanas. Inibe a agregação plaquetária, evitando a união ao fibrinógeno ao factor de Von Willebrand. | FDA: 5 de Novembro de 1994          |

| Produto                        | Companhia                      | Aplicações  | Registado pela FDA e/ou EMEA   |
|--------------------------------|--------------------------------|---|--|
| Nofetumomab (Verluma)          | Boehringer Ingelheim Pharma KG | Fab de NR-LU-10, IgG2b de rato. Específico de uma glicoproteína de 40 Kd expressa em numerosos tumores: pulmão, colon, mama, pâncreas, rins e próstata. Unidos ao Tecnécio 99m (Breitz H.B., 1997). | FDA: 20 de Agosto de 1996  |
| Imciromab-Pentetate (Myoscint) | Centocor B.V.                  | Fab de rato ligado ao Índio 111, unindo-se à miosina cardíaca humana (Malki A. et al., 1999).   | FDA: 3 de Julho de 1996  |
| Arcitumomab (CEA-Scan)         | Immunomedics Inc.              | Fragmento de anticorpo de rato ligado ao Tecnécio 99. Reconhece o antígeno carcinoembrionário (Fuster D. et al, 2003). Indicado no tratamento do carcinoma do cólon o recto.                        | FDA: 28 de Junho de 1996<br>EMEA: 4 de Outubro de 1996, retirado 14 Novembro 2005. |
| Capromab Pendetide ProstaScint | Cytogen Corp.                  | Anticorpo de rato ligado ao Índio 111. Usado na detecção do carcinoma da próstata. Reconhece o antígeno específico do cancro da próstata  | FDA: 28 de Outubro de 1996   |
| Daclizumab (Zenapax)           | Hoffman-LA Roche Inc.          | Anticorpo IgG1 humanizado que se liga a IL-2 $\alpha$ . Aplicado na rejeição aguda de aloenxertos renais.   | FDA: 12 de Outubro de 1997<br>EMEA: 26 de Fevereiro 1999                           |
| Rituximab (Rituxan)            | Genentech Inc.                 | Anticorpo quimérico que reconhece o CD20 dos linfócitos B. Indicado no tratamento de linfomas não Hodgkin.  | FDA: 26 Novembro 1997<br>EMEA: 2 Junho 1998  |
| Remicade (Infliximab)          | Centocor (Johnson & Johnson)   | Anticorpo quimérico que reconhece o TNF- $\alpha$ . Utilizado no tratamento da artrite reumatóide (Targan S.R., 1997).  | FDA: 13 Novembro 1998<br>EMEA: 1 Fevereiro 2002                                    |
| Basiliximab (Simulect)         | Novartis Pharmaceutical Corp.  | Anticorpo Quimérico que reconhece o IL-2 $\alpha$ (CD25). Aplicado na rejeição do transplante renal (Lorber M.I. et al, 2000).  | FDA: 5 de Dezembro de 1998<br>EMEA: 13 de Agosto de 1999                           |
| Palivizumab (Sinagis)          | Medimmune Inc.                 | IgG1 humanizado, frente a um epítipo que se encontra no espaço antigénico A da proteína de fusão (F) do vírus RSV (EMEA H/C/257, 2005).   | FDA: 19 de Junho de 1998<br>EMEA: 13 de Agosto de 1999                             |

| <b>Produto</b>                   | <b>Companhia</b>                                  | <b>Aplicações</b>  | <b>Registado pela FDA e/ou EMEA</b>                        |
|----------------------------------|---|--|--|
| Trastuzumab (Herceptin)          | Genentech Inc.                                    | IgG humanizado contra o receptor HER2 de células tumorais da mama (EMA H/C/353, 2005).   | FDA: 25 de Setembro de 1998<br>EMA: 28 de Agosto De 2000   |
| Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) | Wyeth Averst                                      | Anticorpo humanizado que reconhece a molécula CD33, aplicado no tratamento da leucemia mieloide aguda (Cohen A.D. et al, 2002).                              | FDA: 17 de Maio de 2000                                    |
| Alemtuzumab (Campath)            | Millennium/ Ilex Partners LP                      | Anticorpo Humanizado que reconhece a molécula CD52 de linfócitos B em casos de leucemia linfocítica crónica (EMA H/C/357, 2005).                             | FDA: 7 de Maio de 2001<br>EMA: 6 de Junho de 2001          |
| Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin)   | IDEC Pharmaceuticals Corp.                        | Anticorpos de rato marcados com Itrio 90 contra a molécula CD20. Tratamento do linfoma não Hodgkin de baixo grau folicular (EMA H/C/0547).                   | FDA: 19 de Fevereiro de 2002<br>EMA: 16 de Janeiro de 2004 |
| Adalimumab (Humira)              | Abbott Laboratories                               | Anticorpo humano que reconhece o TNF- $\alpha$ . Utilizado para no tratamento da artrite reumatoide.   | FDA: 31 De Dezembro de 2002<br>EMA: 8 de Setembro de 2003  |
| Omalizumab (Xolair)              | Genentech Inc./ Roche                             | Anticorpo IgE humanizado utilizado no tratamento da asma severa persistente (EMA H/C/606).   | FDA: 15 de Maio de 2003<br>EMA: 25 de Outubro de 2005      |
| Tositumomab (Bexxar)             | GlaxoSmithKline                                   | Anticorpo de rato marcado com Iodo131 que reconhece o CD20 humana e é utilizado no tratamento do linfoma não Hodgkin folicular (Kaminski M.S. et al., 2005). | FDA: 30 de Junho de 2003                                   |
| Efalizumab (Raptiva)             | Genentech Inc./ Roche                             | Anticorpos humanizado anti-CD11a utilizado no tratamento da psoríase na placa crónica (Papp K.A. et al., 2007).  | FDA: 27 de Outubro de 2003                                 |
| Cetuximab (Erbix)                | ImClone Systems/ Bristol-Myers Squibb/ Merck KgaA | Anticorpo quimérico IgG1 frente ao receptor de crescimento epidérmico (EGFR) utilizado na terapia do cancro colo-rectal (Bonner J. et al., 2004).            | FDA: 12 de Fevereiro De 2004                               |
| Bevacizumab (Avastin)            | Genentech Inc.                                    | Anticorpo Humanizado que se une à família VEGF. Inibe o crescimento de tumores reduzindo a vascularização. (EMA H/C/0582, 2005).                             | FDA: 26 de Fevereiro de 2004<br>EMA: 12 de Janeiro de 2005 |

| <b>Produto</b>         | <b>Companhia</b>             | <b>Aplicações</b>  | <b>Registado pela FDA e/ou EMEA</b>                     |
|------------------------|------------------------------|--|---|
| Natalizumab (Tysabri)  | Biogen Idec                  | Anticorpo humanizado anti-CD49d. Indicado no tratamento da esclerose múltipla (Gold R. et al., 2006, Sweet 2007).                                      | FDA: 5 de Junho de 2006<br>EMEA: 3 de Julho de 2006     |
| Lucentis (Ranibizumab) | Genentech Inc.               | Anticorpo Humanizado que se une ao VEGF-A. Indicado na Degeneração da mácula associada à idade (DMAE).   | FDA: 30 de Junho de 2006<br>EMEA: 22 de Janeiro de 2007 |
| Panitumumab (Vectibix) | Amgen                        | Anticorpo humano IgG2/ kappa frente ao factor de crescimento epidérmico (EGFR), utilizado na terapia do cancro colo-rectal (Giusti R.M. et al., 2007). | FDA: 27 De Setembro de 2006                             |
| Eculizumab (Soliris)   | Alexion Pharmaceuticals Inc. | Anticorpo humanizado indicado na hemoglobinúria paroxística nocturna (PNH) (Kathula S.K., 2006).   | FDA: 16 de Março de 2007<br>EMEA: 26 de Abril de 2007   |

Os anticorpos monoclonais são utilizados na terapia devido ao seu modo de actuação e funcionamento, podendo estes actuar como anticorpos não conjugados ou nus, ou como imunoconjugados.

Os anticorpos não conjugados apresentam uma actuação mais directa relativamente à célula alvo, podendo ligar-se directamente a estas e provocar a morte da célula por apoptose, inibir a sua proliferação ou bloquear moléculas relacionadas com a adesão celular. Por outro lado, este pode ainda servir de marcador, tornando o antígeno reconhecível ao sistema imune, o que possibilita a actuação de outros mecanismo do sistema imune, tal como o complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, fagocitose, etc. (figura nº.7).

Com o desenvolvimento da Nanotecnologia, a utilização de imunoconjugados tem vindo a aumentar devido ao seu potencial uso como transportadores de substâncias citotóxicas, como radioisótipos, toxinas, drogas (figura nº.7), de modo a actuarem somente no tecido lesado, e não afectar os tecidos saudáveis.

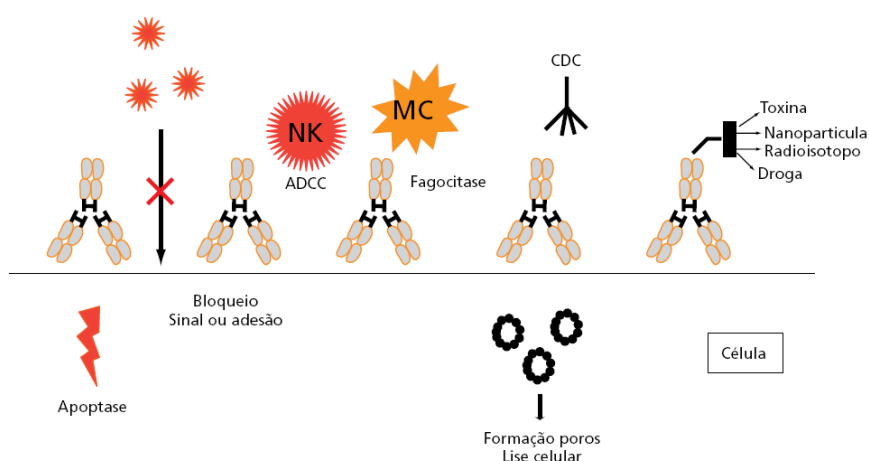


Figura nº.7 – Mecanismos desenvolvidos pelos anticorpos nus e conjugados. NK: célula Natural Killer; ADCC: Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo; MC: Macrófago; CDC: Citotoxicidade Dependente de Complemento (Sharkey R.M. e Goldenberg D.M., 2006).

Nos últimos anos, uma molécula que se tem vindo a estudar devido ao seu potencial uso terapêutico é a molécula de HLA-DR. Esta molécula faz parte do Complexo Maior de Histocompatibilidade Humano (HLA) que se encontra localizado no braço curto do cromossoma 6 compreendendo uma região de genes altamente polimórficos. Este sistema encontra-se expresso na superfície da maioria das células nucleadas do organismo, sendo caracterizado por conferir susceptibilidade ou protecção a diferentes doenças, e responsável pela apresentação de moléculas ao sistema imune.

Existem 3 classes para agrupar os genes pertencentes ao sistema HLA: I, II, e III, encontrando-se a classe I e II envolvida na apresentação do antígeno aos linfócitos T (Alves C. et al, 2005 e Donadi E.A., 2000). A classe I é formada por os *loci*: HLA-A, B e C que se encontram envolvidos na codificação de moléculas de histocompatibilidade presentes em quase todas as células somáticas do corpo Humano. A classe II é formada por os *loci*: HLA-DR; DQ e DP, envolvidas na codificação das moléculas clássicas de histocompatibilidade, que se encontram nas células imunes apresentadoras de antígenos (nomeadamente células B, células dendríticas e macrófagos). Relativamente à classe III, os genes pertencentes a esta classe codificam elementos do sistema complemento.

O sistema maior de histocompatibilidade de classe II tem sido caracterizado como uma molécula propícia na actuação a nível da terapia anti-tumoral, em virtude da sua elevada expressão em células de leucemias e linfomas, e devido à sua baixa expressão em células normais, apenas em monócitos, células dendríticas, linfócitos B, em algumas células epiteliais e linfócitos T). Assim sendo, foram desenvolvidos nos últimos anos diversos anticorpos anti-HLA de classe II tais como Ch-Lym-1 e Hu1D10, os quais demonstram ter uma actividade anti-tumoral e estão a ser envolvidos em diversos estudos clínicos (Abhyankar V.V. et al., 2002; Rech J. et al., 2006).

---

---

## 2- Objectivos

O objectivo principal deste trabalho é aprofundar a caracterização funcional do anticorpo monoclonal humano BH1 para a obtenção de dados que apoiem a sua aplicação na terapia hemato-oncológica.

Objectivos concretos:

- Melhorar o nível de produção do anticorpo BH1
- Avaliar o seu efeito na cultura “in vitro” de linhas tumorais linfóides tipo B
- Determinar a capacidade do anticorpo BH1 em activar a fagocitose.

---



---

### 3- Material e Métodos

#### 3.1- Anticorpos Monoclonais utilizados neste estudo

Os anticorpos utilizados neste estudo foram os seguintes: hAIM-29.16; Ch-Lym1 e BH1 apresentando estes as seguintes características:

***Tabela nº 5- Anticorpos monoclonais utilizados neste estudo e suas características.***

| Anticorpo          | Características   |
|--------------------|---|
| <b>Ch-Lym1</b>     | Produzido e cedido pelo laboratório de Alan Epstein (USA), sendo caracterizado como um anticorpo monoclonal quimérico IgG1, formado por regiões variáveis de origem de rato e regiões constantes de origem Humana.<br>O HLA-DR10 é o imunogénio original utilizado para gerar o anticorpo Ch-Lym1, apresentando este, alta afinidade frente aos antígenos HLA-DR. Posteriormente o Ch-Lym1 foi modificado por técnicas de biologia molecular para obter o anticorpo quimérico utilizado neste estudo (Hu E., 1995). |
| <b>hAIM -29.16</b> | O anticorpo monoclonal Humano hAIM-29.16 pertence à classe dos anticorpos IgM/ $\lambda$ , obtido através do uso de rato transgênicos para a cadeia $\mu$ pesada, bem como $\mu$ e $\lambda$ da cadeia leve (Molina A., 2003). Este anticorpo reconhece o CD69 humano, molécula expressa em linfócitos, monócitos e neutrófilos depois de activadas (Cebrián M. et al., 1998). Estes foram cedidos amavelmente para o estudo pelo grupo de Imunologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo (Espanha).   |
| <b>BH1</b>         | O anticorpo BH1 é caracterizado como anticorpo monoclonal humano da classe IgM/ $\kappa$ , obtido da mesma forma que o anticorpo monoclonal hAIM-29.16. Este anticorpo reconhece especificamente a molécula HLA de classe II que se encontra fundamentalmente na superfície dos monócitos, linfócitos B, células B tumorais (Diaz B., 2008).  |

---

## 3.2- Obtenção e processamento de amostras biológicas

### 3.2.1- Amostras de rato

#### - *Líquido ascítico*

Os animais seleccionados para produção de líquido ascítico através dos hibridomas escolhidos foram ratos Nude (Hsd: Athymic Nude-nu) (Harlan Interfauna Ibérica S.A, Barcelona, Espanha).

A escolha desta estirpe de ratos deve-se ao facto destes apresentarem uma imunodeficiência (caracterizada por uma disgenesia tímica) não apresentando, consequentemente, linfócitos T. Sofrem ainda de defeitos parciais no desenvolvimento das células tipo B, sendo as células NK, macrófagos e granulócitos normais. Isto permite induzir a formação de tumores sem ocorrer o desenvolvimento de resposta imunitária frente aos antígenos tumorais. Os ratos foram mantidos nas instalações da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Vigo (Espanha).

Os ratos Nude receberam uma injeção intra-peritoneal com Pristano (2,6,10,14-Tetrametilpentadecano) (Sigma-Aldrich). Após 15 dias, foi introduzido via intra-peritoneal  $1 - 5 \cdot 10^6$  células do hibridoma desejado (BH1 ou hAIM-29 16) ressuspendidas em 500µl de PBS. A viabilidade das células foi analisada mediante contagem em câmara de Neubauer, com Azul de Tripán, sendo superior a 90%.

Após uma ou duas semanas da introdução do hibridoma, foi extraído o líquido ascítico do abdómen do rato, utilizando uma agulha de 20G (Microlance, Becton Dickinson, Huesca). A colheita é efectuada deixando sair livremente o líquido ascítico pela agulha, sendo posteriormente depositado em tubos eppendorfs. As amostras são levadas a centrifugar a 13 000 r.p.m durante 5 minutos, sendo recolhido o sobrenadante e preparadas alíquotas que são conservadas a -20°C. A colheita pode ser repetida durante três ou quatro dias, sendo posteriormente sacrificado o rato. Todo este processo foi realizado no biotério da Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo (Espanha), sendo as ascites enviadas ao Instituto Superior de Saúde do Alto Ave (ISAVE).

---

### **3.3- Amostras Humanas**

#### **3.3.1- Sangue periférico**

As amostras de sangue periférico foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis voluntários do ISAVE (Instituto Superior de Saúde do Alto Ave), sendo colhidas em tubos (Tapval K3E/EDTA 3K 3ml Aquisel).

#### **3.3.2- Obtenção de células mononucleares de sangue periférico**

A fracção mononuclear pode ser isolada de sangue periférico e de outros fluídos mediante centrifugação celular diferencial em gradiente de densidade através de Ficoll- Hypaque (Ficoll-Paque<sup>tm</sup> PLUS Amersham Biosciences).

Num tubo Falcon de 15 ml (Sterilin), coloca-se 3ml de solução de Ficoll, posteriormente, adiciona-se suavemente a amostra de sangue previamente diluída com PBS 1x (8g de ClNa, 0,2g de ClK, 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 1L de água destilada)

As células são levadas a centrifugar 20 minutos a 2500 r.p.m a temperatura ambiente, numa centrífuga (Centrifuge 5810R Eppendorf), sendo posteriormente observada a fracção de células mononucleares.

A fracção mononuclear é retirada com apoio de uma pipeta de Pasteur, sendo lavada duas vezes em meio RPMI 10% FCS, centrifugando a 1200 r.p.m durante 10 minutos.

#### **3.3.3- Obtenção de polimorfonucleares**

A fracção polimorfonuclear (PMN) foi isolada de sangue periférico mediante centrifugação celular diferencial em gradiente de densidade através de Ficoll-Hypaque.

De modo a retirar a fracção celular polimorfonuclear, foi retirada a camada de células que se encontrava logo acima da camada de eritrócitos, procedendo-se à lise dos eritrócitos, através de choque hipotónico com água esterilizada.

Após retirar a fracção polimorfonuclear com apoio de uma Pipeta de Pasteur, esta foi resuspendida em meio de cultura RPMI 10% FCS, sendo determinada a viabilidade celular mediante a utilização de Azul de Tripiano no microscópio óptico.

### 3.4- Linhas celulares tumorais

As linhas Tumorais utilizadas no decorrer deste trabalho foram: Jurkat, Daudi, Raji e Hmy-2, sendo descritas na tabela seguinte as suas diferentes características no que diz respeito à sua origem, espécie procedente, meio de cultura utilizado para conservação e proliferação, e sua designação adoptada pelo catálogo American Type Culture Collection (ATCC).

**Tabela nº6- Linhas tumorais utilizadas, e suas características.**

| Linha  | Espécie | Origem                          | Meio de cultura | Características                            | Registo ATCC  | Referência      |
|--------|---------|---------------------------------|-----------------|--|---------------|-----------------|
| Jurkat | Humana  | Leucemia Aguda T                | RPMI 10% FCS    | Características fenotípica de linfocitos T | ATCC CRL 1593 | Gilliss 1980    |
| Daudi  | Humana  | Linfoma de Burkitt              | RPMI 10% FCS    | Linfoblasto B                              | ATCC CCL 213  | Klein 1968      |
| Raji   | Humana  | Linfoma de Burkitt              | RPMI 10% FCS    | Linfoblasto B                              | ATCC CCL 86   | Pulvertaft 1963 |
| Hmy-2  | Humana  | Leucemia de células plasmáticas | RPMI 10% FCS    | Linfoblasto B                              | ATCC CRL 1621 | Edwards 1982    |

As células foram conservadas a 37°C numa estufa com mais 5% de CO<sub>2</sub> (Waterjacket CO<sub>2</sub> Incubators da casa comercial Shel Lab) em flasks estéreis de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (Costar Corning Incorporated). A manipulação das células decorreu em esterilidade utilizando para o efeito a câmara de fluxo laminar vertical (Niive LN 090). O meio de cultura utilizado foi o meio RPMI 1640 (GlutaMax Gibco 72400 Invitrogen) com suplemento de 10% de FCS- Soro bovino fetal (PAA, laboratories) previamente descomplementado durante 1H30 a 56°C, e de antibiótico Estreptomicina (100µg/ml) e Penicilina (100µg/ml) (Invitrogen) sendo esta junção denominada de meio completo ao longo do texto.

De modo a analisar o crescimento celular, a presença ou ausência de contaminação (microbiana ou fúngica), a visualização das células foi efectuada mediante o uso de um microscópio invertido (Olympus IX50).

### 3.5- Contagem e determinação da viabilidade celular

Para efectuar o estudo da viabilidade celular, foi realizada uma contagem celular em câmara de Neubauer de volume 0,100mm (Improved CE Tiefel.Depth Marien Feld), utilizando um microscópio óptico (Motic B1 Séries System Microscopes). As células foram diluídas (1/10 e 1/100) numa solução de Azul de Tripiano (Trypan Blue) a 0,2% de PBS (p/v). Através da utilização deste composto, é possível determinar a viabilidade celular, já que este tem a característica de penetrar

nas células que apresentam a membrana celular danificada visualizando-se uma coloração azul nas células mortas.

### 3.6- Quantificação de Anticorpos Monoclonais

#### 3.6.1- Quantificação do anticorpo monoclonal

Para determinar a concentração de AcMos Humano nas ascites procedeu-se a execução da técnica de ELISA tipo sandwich, sendo os anticorpos utilizados nesta técnica os seguintes:

***Tabela nº7 – Anticorpos utilizados na técnica de ELISA para determinar a concentração de AcMos Humanos no sobrenadante dos hibridomas.***

| Especificidade | Espécie | Marcador | Uso     | Casa comercial                          |
|----------------|---------|----------|---------|---|
| IgM Humana     | Coelho  | Ausência | 2 µg/ml | Dako, Glostrup, Denmark                 |
| IgM Humana     | Coelho  | Biotina  | 1/10000 | Jackson Laboratories, Pennsylvania, USA |

Na execução desta técnica foram utilizadas placas de 96 poços cloreto de vinilo com fundo plano (Falcon, New Jersey), na qual foi adicionado 50µl de anticorpo policlonal anti-cadeia pesada M Humana em cada poço, com concentração de 2µg/ml diluído em PBS, sendo esta levada a incubar toda a noite a 4°C.

Após decorrer o tempo de incubação, a placa foi lavada três vezes com solução de PBS/ 0,01% Tween 20 (v/v) (Scharleau), sendo os poços bloqueados durante 2 horas com 200µl em PBS (p/v) 1% de albumina de soro bovino fetal (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis) de forma a evitar uniões inespecíficas. Posteriormente, adiciona-se 50µl de sobrenadante da ascite puros ou diluídos em PBS / BSA 1%, sendo a placa levada a incubar durante 2 horas a 4°C. Procede-se a uma lavagem utilizando PBS 1x com 0,01% de Tween 20 (PBS/Tween) adicionando-se posteriormente o anticorpo secundário (anticorpo anti-IgM Humano), marcado com biotina (diluídos em PBS 1x com 1% BSA), sendo levada a placa a incubar durante 2 horas a 4°C.

Após duas lavagens com PBS/Tween é adicionada a enzima peroxidase conjugada com avidina (DAKO) que se vai ligar à biotina levando a placa a incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente a reacção colorimétrica foi desenvolvida com o substrato 2,2'-Azino-bis 3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) (Sigma) preparado segundo as instruções da casa comercial, após visualização de cor, a reacção colorimétrica foi parada utilizando ácido cítrico 0,1M com azida sódica 0,01%.

---

Por fim, efectuou-se a leitura da placa num leitor de ELISA (Microplate Reader Sírío SEAC).

De notar que alguns poços não apresentavam amostra de hibridoma (mas PBS / BSA), servindo como branco. Os controlos positivos e a recta padrão foram preparados a partir de soro Humano comercial (Beckman, Fullerton) que apresentam uma quantidade rigorosamente conhecida de IgM.

### **3.7- Análise do reconhecimento das linhas tumorais mediante imunofluorescência indirecta**

Previamente à realização dos estudos funcionais foi necessário confirmar mediante imunofluorescência indirecta a presença de anticorpos específicos frente às células tumorais nas ascites utilizadas.

Para tal foram incubadas durante 45 minutos e a 4°C,  $5 \cdot 10^5$  células tumorais com 50µl de meio de cultura RPMI ou de diferentes diluições das amostras a analisar (ascites). Após decorrer o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes utilizando meio de cultura RPMI, sendo de seguida incubadas com anticorpo secundário anti-IgM Humano marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) durante 30 minutos a 4°C, sendo de seguida lavadas de novo as células. As células foram analisadas directamente através de citometria de fluxo usando o equipamento XL-MCL Flow Cytometer (Coulter Electronic Hialeah, FL).

### **3.8- Estudos funcionais realizados com BH1, Ch-Lym1 e hAIM-29.16**

#### **3.8.1- Agregação homotípica induzida pelos anticorpos**

As linhas celulares tumorais: Raji, Daudi, Hmy-2, e Jurkat foram analisadas de modo a determinar a presença de agregação homotípica e/ou diferenciação celular quando em contacto com diferentes anticorpos: Ch-Lym1, BH1, hAIM-29.16.

Para tal, foram cultivadas em placas de 96 poços  $25 \cdot 10^3$  células/ml em meio RPMI com 10% de FCS, adicionando-se a cada poço 150µl dos anticorpos a testar com concentração de 5µg/ml ou 2,5µg/ml. O teste foi realizado utilizando duas temperaturas diferentes (37°C e 4°C) de modo a descartar a possibilidade do efeito visualizado ser consequência apenas da estrutura polimérica e/ou bivalentes dos anticorpos. A visualização dos resultados foi efectuada após 4 horas e 24 horas de incubação com o uso de um microscópio invertido (Olympus DP71), sendo as fotos retiradas através de uma máquina fotográfica (Olympus IX 50).

---

### 3.9- Avaliação da fagocitose

#### 3.9.1- Ensaio “in vitro” de activação da fagocitose

Para a realização deste ensaio foram utilizados os seguintes tipos de células efectoras humanas: células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) e células polimorfonucleares (PMN).

No caso das células mononucleares (isoladas segundo o método descrito no ponto 3.3.2) foram previamente activadas mediante a incubação durante 7 dias a 37°C com mais 5% de CO<sub>2</sub> (Waterjacket CO<sub>2</sub> Incubators da casa comercial Shel Lab) em presença de 5nM de GM-CFS (Factor Estimulante de Colónias de granulócitos e macrófagos). O meio de cultura utilizado para manter as células foi o meio RPMI com 10% FCS.

Após decorrer o tempo de incubação, os diferentes tipos de células efectoras utilizadas PBMC e PMN são retirados da placa e resuspendidos em meio de cultura RPMI + 10% FCS, sendo incubados a 37°C com mais 5% de CO<sub>2</sub> a uma concentração de 150000 células numa placa de 96 poços.

As células tumorais alvo (Hmy-2) foram marcadas com o agente fluorescente CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (que tem como função marcar as células com fluorescência verde) seguindo as instruções da casa comercial.

Posteriormente estas células foram incubadas durante 30 minutos a 4°C em presença de 5µg/ml dos anticorpos a testar (Ch-Lym1; BH1; hAIM-29.16). Após o tempo de incubação, as células tumorais foram adicionadas aos poços que continham as células efectoras, mantendo as seguintes proporções: 10 células efectoras / 1 células alvo; 25 células efectoras / 1 células alvo; 50 células efectoras / 1 célula alvo; e incubadas durante 4 ou 18 horas a 37°C.

De seguida, as células foram retiradas dos poços e previamente à análise dos resultados as células foram incubadas com anticorpo anti-CD13-PE (Ficoeritrina, Imumunotech), de forma a marcar as células efectoras (fluorescência laranja).

A análise da fluorescência da amostra foi efectuada mediante citometria de fluxo (XL-MCL Flow Cytometer). As células marcados com CFSE foram analisadas no canal FL-1 (comprimento de emissão de 530nm), enquanto que as células efectoras (mononucleares, monócitos e neutrófilos) foram analisadas no canal FL-2 (comprimento de onda de 575nm). As células alvo tumorais foram definidas como células marcadas: CFSE + / anti-CD13-PE -, enquanto que as células efectoras foram definidas como CD13-PE + / CFSE -, e as células tumorais fagocitadas como CD13-PE + / CFSE + (duplo positivo). Todos os testes foram realizados em duplicado. A fórmula utilizada no cálculo da fagocitose foi a seguinte: % Fagocitose=  $100 \times [( \text{percentagem de células tumorais fagocitadas} ) / ( \text{percentagem de células tumorais fagocitadas} + \text{percentagem de células alvo tumorais} )]$ .

---



---

## 4- Resultados

A técnica de fusão celular e obtenção de hibridomas desenvolvida por C. Milstein e G. Kohler permite obter de forma indefinida anticorpos de especificidade conhecida, no entanto, o nível de secreção de anticorpo altera consoante o hibridoma. Os hibridomas utilizados neste estudo (BH1 e hAIM-29.16) secretam IgM humana a uma concentração de 0,5-2µg/ml, sendo necessário desenvolver outros mecanismos para poder obter maior quantidade de anticorpo e levar a cabo os estudos posteriores.

Neste trabalho, optou-se pela produção de ascites em ratos Nude, e embora os resultados obtidos sejam diversos, pode-se aumentar os níveis de secreção até aproximadamente 30 vezes mais que o cultivo “in vitro” (tabela nº8).

**Tabela nº. 8 – Níveis de Produção de anticorpo pelos hibridomas BH1 e hAIM-29.16.**

| Hibridoma  | [Ac] IgM µg/ml<br>Sobrenadante* | [Ac] IgM µg/ml<br>Ascite | Teste de avaliação  |
|------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------|
| BH1        | 0,5-2                           | 6 – 70                   | ELISA tipo sandwich |
| hAIM-29.16 | 0,5-2                           | 10 – 60                  | ELISA tipo sandwich |

\* Dados fornecidos pelo grupo de Imunologia da Universidade de Vigo (Espanha)

Como é referido no capítulo de Materiais e Métodos, o anticorpo BH1 reconhece a molécula HLA-II. Trabalhos prévios (Diaz B, 2008) indicam que este anticorpo apresenta elevada possibilidade de utilidade na terapia de processos hemato-oncológicos (fundamentalmente de origem linfóide tipo B) devido à sua capacidade de activar o sistema do complemento humano e lisar as células tumorais.

Sendo o objectivo fundamental deste estudo avaliar outros efeitos “anti-tumorais” do anticorpo BH1 frente a células tumorais tipo B (ver tabela nº.5 no capítulo Materiais e Métodos) e comparar a sua actividade com a actividade do anticorpo Ch-Lym1 (Gingrich R.D., 1990), é necessário confirmar que as ascites utilizadas neste trabalho apresentam anticorpos que reconhecem as células tumorais utilizadas. Como indicamos no exemplo da figura nº.8, os estudos de imunofluorescência indirecta confirmaram que a ascite produzida com o hibridoma BH1, apresenta IgM humano, que reconhece as células Raji, Hmy-2 e Daudi, no entanto, e como era esperado, o anticorpo BH1 não reconhece as células Jurkat.

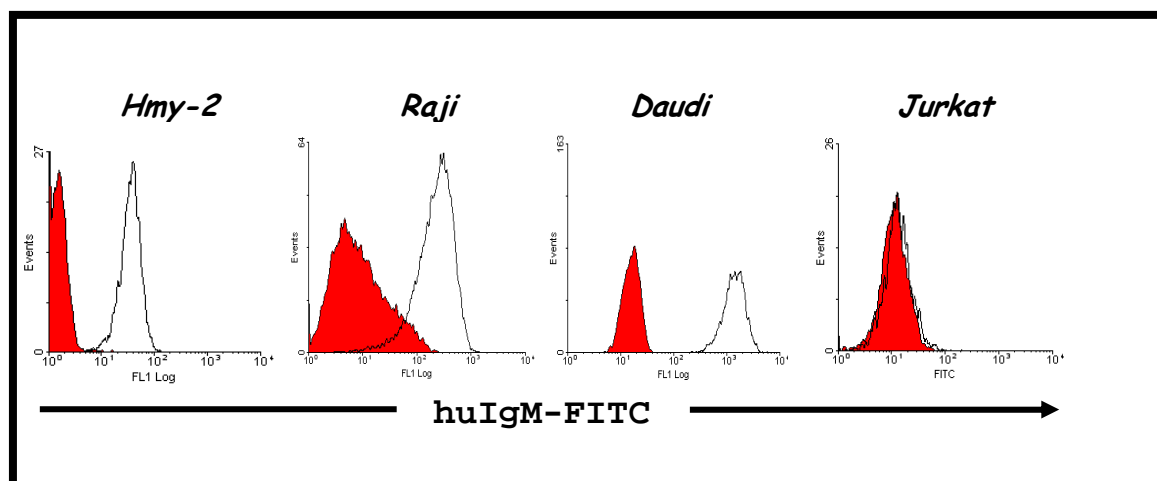


Figura nº.8: Gráfico uniparamétrico obtido pelo Citómetro de fluxo, de modo a avaliar o reconhecimento das linhas tumorais Hmy-2, Raji, Daudi e Jurkat, pelo anticorpo IgM humano presente nas ascites obtidas através do hibridoma BH1. Como controlo (histograma vermelho), utilizaram-se células incubadas só com o anticorpo secundário (anti-IgM humano FITC). Exemplo representativo, concentração de anticorpo BH1 na ascite 5µg/mL.

A união do anticorpo a moléculas de membrana celular pode originar a diferenciação morfológica, assim como à activação ou inibição da síntese e expressão de moléculas de adesão, que consequentemente levam à agregação celular.

Com apoio de um microscópio invertido, comparou-se o efeito dos anticorpos BH1 e Ch-Lym1 relativamente à morfologia de células tumorais que expressam HLA-II: Hmy-2, Daudi e Raji, assim como, na activação da agregação. Para assegurarmos que o efeito observado ocorreu devido à união dos anticorpos, e não por outros componentes presentes no meio ou na ascite, utilizaram-se como controlos as linhas tumorais Jurkat (não expressam HLA-II e não é reconhecida por anticorpos BH1 e Ch-Lym1) e ascites obtidas com o hibridoma hAIM-29.16.

Como indicado na tabela nº.9, somente o anticorpo Ch-Lym1 é capaz de induzir agregação homotípica das células Hmy-2 e Daudi, após incubação a 37°C com mais 5% de CO<sub>2</sub> na presença de 5 ou 2,5µg/ml de anticorpo (Tabela nº.9). Este efeito foi observado passadas 4 horas de incubação, mantendo-se após 24 horas. No caso das células Raji, não se detectou uma clara formação de agregados, o que pode ter ocorrido devido à forte adesão que estas estabelecem com o plástico da placa de cultura. Relativamente ao anticorpo BH1, que também reconhece a molécula HLA-II, este não induziu agregação celular, o que confirma que ambos os anticorpos reconhecem epítomos antigénicos diferentes, e que a união destes não provoca o mesmo efeito sobre as células.

**Tabela Nº.9: Agregação das células tumorais Jurkat, Daudi, Hmy-2 e Raji na presença de anticorpos a 37°C e a 4°C\*.**

|             |               | BH1 | hAIM-29.16 | Ch-Lym1 |
|-------------|---------------|-----|------------|---------|
| <b>37°C</b> | <b>Jurkat</b> | -   | -          | -       |
|             | <b>Raji</b>   | -   | -          | +/-     |
|             | <b>Hmy-2</b>  | -   | -          | +       |
|             | <b>Daudi</b>  | -   | -          | +       |
| <b>4°C</b>  | <b>Jurkat</b> | -   | -          | -       |
|             | <b>Raji</b>   | -   | -          | -       |
|             | <b>Hmy-2</b>  | -   | -          | -       |
|             | <b>Daudi</b>  | -   | -          | -       |

\* Resultados obtidos após 4 e 24 horas de incubação com 5 e 2,5 µg/mL.

Devido ao facto dos anticorpos possuírem mais que um local de união ao antígeno, a agregação celular observada poderia dever-se à formação de uma “rede” entre os anticorpos e as células. Se este facto for certo, seria esperado observar agregados celulares de forma independente do metabolismo celular, bem como da temperatura em que decorreu este processo. Para descartar esta possibilidade, efectuou-se o mesmo teste a uma temperatura de 4°C. Como se demonstra na tabela nº.9, e nas fotos obtidas com as células Hmy-2 (figura nº.9) nenhum dos anticorpos induziu agregação a esta temperatura, o que indica que os efeitos do anticorpo Ch-Lym1 se devem à modulação da expressão de moléculas da membrana, e que este processo é dependente do metabolismo celular.

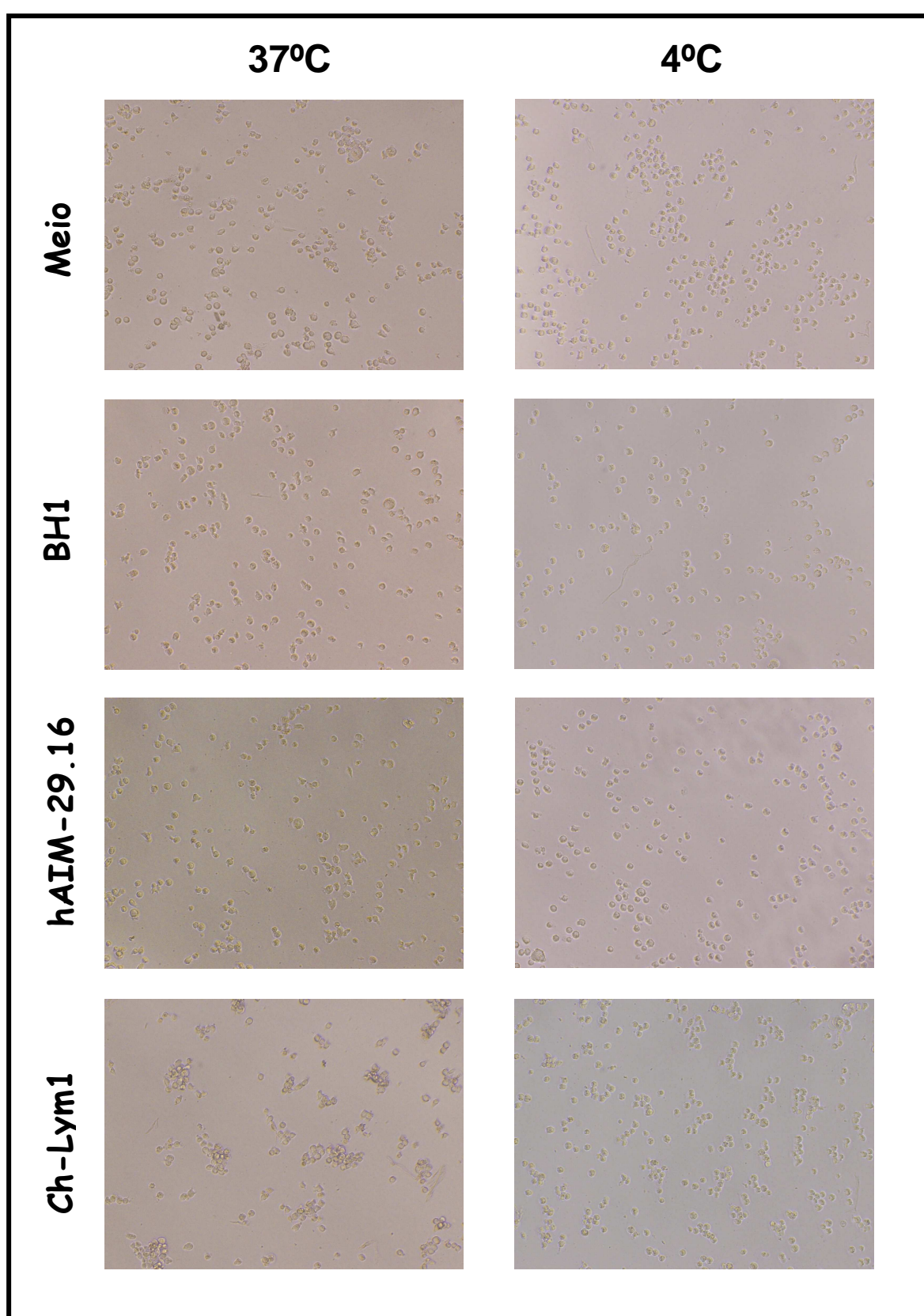


Figura nº.9: Agregação das células Hmy-2 após incubação durante 4 horas na presença de meio de cultura com concentração de 5µg/ml de anticorpo BH1, hAIM-29.16 e Ch-Lym1. O processo decorreu a 37°C (esquerda) e a 4°C (direita). As fotos foram obtidas através de um microscópio invertido utilizando a objectiva de 10. Os mesmos resultados foram obtidos ao incubar as células com uma concentração de 2,5µg/ml de anticorpo.

Um dos mecanismos efectores que podem activar os anticorpos para eliminarem células tumorais é a fagocitose. Estudos prévios indicam que tanto células mononucleares de sangue periférico (PBMC) activadas na presença de GM-CSF, como células polimorfonucleares (PMN) podem desenvolver processos de fagocitose celular. Este processo pode ser mediado por anticorpos e depende da interacção da região Fc com receptores presentes nas células efectoras (Watanabe M., 1999).

De modo a verificar se o anticorpo BH1 activa a fagocitose de células tumorais, foram realizados ensaios com a linha tumoral Hmy-2, como célula alvo, e com dois tipos de células efectoras: PBMC previamente incubadas na presença de 5nM de GM-CSF e PMN humanas, obtidas no mesmo dia da realização do ensaio. Como controlo negativo, foi utilizado o anticorpo hAIM-29.16 e como controlo positivo o anticorpo Ch-Lym1. Em todos os casos a concentração de anticorpo utilizada foi de 5µg/mL.

Os resultados obtidos por Citometria de fluxo, após repetir os ensaios duas vezes com células efectoras de indivíduos diferentes, indicam diferenças no nível de fagocitose em relação ao anticorpo utilizado e a origem das células efectoras. Se por um lado, se verifica que o anticorpo Ch-Lym1 é capaz de activar a fagocitose independentemente do tipo de célula efectora e do indivíduo, o anticorpo BH1 apenas mostrou activação da fagocitose num dos casos (Tabela 10). Como era de esperar a percentagem de células fagocitadas aumentou consoante o número de células efectoras.

**Tabela nº. 10- Activação da fagocitose mediada pelos anticorpos BH1 e Ch-Lym1\***

|                  | Anticorpo BH1           |      |      |                        |      |      | Anticorpo Ch-Lym1       |      |      |                        |      |      |
|------------------|-------------------------|------|------|------------------------|------|------|-------------------------|------|------|------------------------|------|------|
|                  | PBMC <sup>1</sup> (T:E) |      |      | PMN <sup>2</sup> (T:E) |      |      | PBMC <sup>1</sup> (T:E) |      |      | PMN <sup>2</sup> (T:E) |      |      |
|                  | 1:10                    | 1:25 | 1:50 | 1:10                   | 1:25 | 1:50 | 1:10                    | 1:25 | 1:50 | 1:10                   | 1:25 | 1:50 |
| <b>Amostra 1</b> | -                       | -    | -    | -                      | -    | -    | +                       | +    | +    | +                      | +    | +    |
| <b>Amostra 2</b> | -                       | +    | +    | -                      | -    | +    | +                       | +    | +    | +                      | +    | +    |

\* Como controlo foi utilizado o anticorpo hAIM29.16 que não reconhece as células alvo. A concentração de anticorpo utilizado em todos os casos foi 5µg/mL

- 1- PBMC; Células Mononucleares de sangue periférico activadas previamente com GM-CSF. É indicado também a relação entre o número de células alvo e o número de células efectoras (T:E).
- 2- PMN; Células Polimorfonucleares de sangue periférico. Também é indicada a relação entre o número de células alvo e o número de células efectoras (T:E).

Os resultados obtidos no Citómetro de Fluxo são mostrados nas figuras 10 e 11. Na figura 10 o PBMC é utilizado como células efectoras, a um ratio de 1 célula alvo por 25 efectoras. Verifica-se que tanto o anticorpo BH1 como o anticorpo Ch-Lym1 promovem a fagocitose das células tumorais na presença das células PBMC activadas com CM-CSF, apresentando o anticorpo Ch-Lym1 maior poder de activação (figura nº10). Em relação ao uso de células PMN, são muito semelhantes. A percentagem de células tumorais fagocitadas no caso da figura 11 é maior, que os valores obtidos na figura 10, se bem que este resultado é devido ao facto de utilizarem um ratio de 1 célula alvo por cada 50 efectoras. Relativamente ao anticorpo hAIM-29.16, como era de esperar a percentagem de células fagocitadas na sua presença é muito baixa, sendo semelhante aos resultados obtidos em ausência de anticorpo, já que este não reconhece às células Hmy-2.

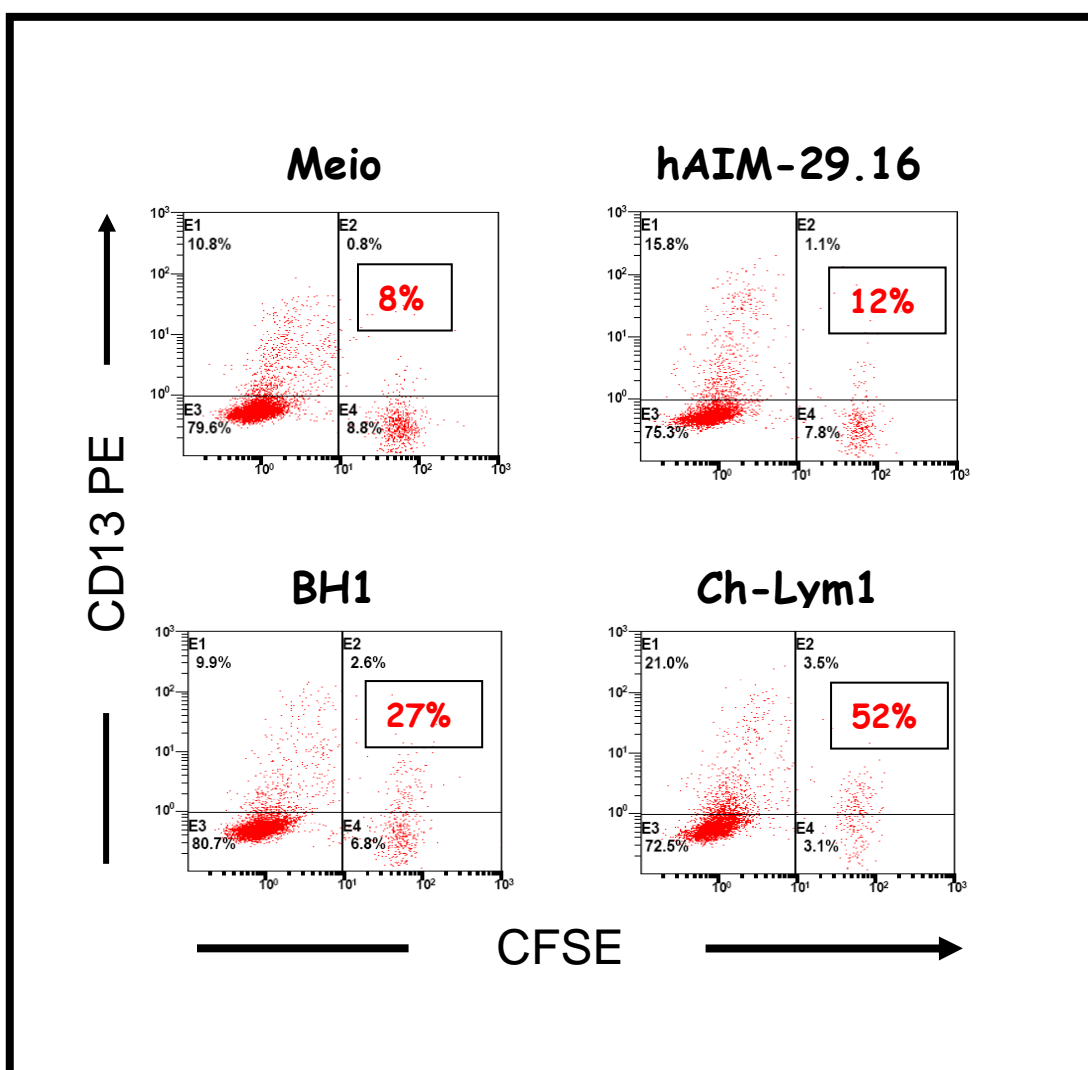


Figura nº.10 – Indução da fagocitose das células tumorais Hmy-2 (marcadas com CFSE) pelos PBMC na presença do anticorpo BH1, hAIM-29.16 e Ch-Lym1. O anticorpo anti-CD13 marca às células com capacidade fagocítica. Resultados obtidos depois de 18 horas de incubação.

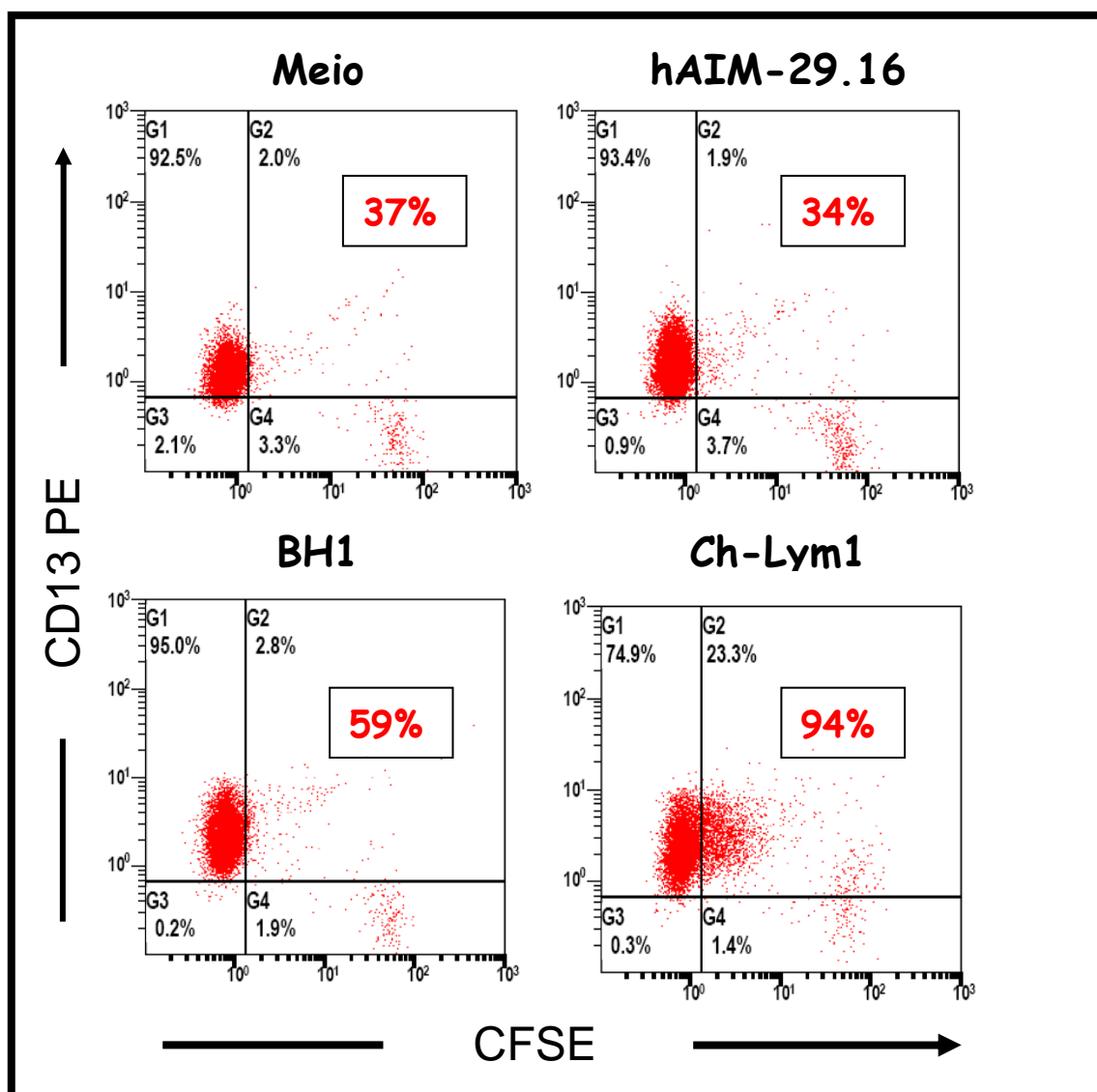


Figura nº.11 – Indução da fagocitose das células tumorais Hmy-2 (marcadas com CFSE) pelos PMN na presença do anticorpo hAIM-29.16, BH1 e Ch-Lym1. Resultados obtidos depois de 4 horas de incubação.

---



---

## 5- Discussão e conclusão

A utilização de anticorpos em áreas de investigação biomédica e na terapia tem apresentado um acréscimo muito acentuado nos últimos anos, sendo estas “balas mágicas” utilizadas com diversos fins terapêuticos: prevenção da rejeição de transplantes, patologias auto-imunes, enfarte do miocárdio, imunoterapia tumoral, etc. (Berger M. et al., 2002).

Verificando-se que as doenças oncológicas cada vez mais representam um problema importante na sociedade, e tendo em conta, que muitas das terapias aplicadas na actualidade são inespecíficas e agressivas para os doentes, é de todo pertinente desenvolver novas terapias tumor-específicas, que não acarretem toxicidade para o doente, como por exemplo os Anticorpos Monoclonais Humanos (William E.P., 1999).

Para que a terapia com anticorpos seja eficaz, é necessário verificar quais as moléculas que se expressam apenas nas células tumorais de modo a tornar a resposta dos anticorpos específica. Uma das moléculas que tem vindo a ser estudada, é a molécula HLA classe II, sendo um alvo terapêutico emergente em neoplasias hematológicas, em virtude da sua elevada expressão em células de leucemias e linfomas, e devido à sua baixa expressão em células Humanas (monócitos, células dendríticas, linfócitos B e algumas células epiteliais e T). Como tal, têm sido desenvolvidos anticorpos IgG anti-HLA class II, como o anticorpo Ch-Lym1 (quimérico) e HuD10 (humanizado) (Gilliland L.K., 1999).

Na terapia humana, geralmente são desenvolvidos anticorpos do isótipo IgG, devido à sua especificidade e maior nível de penetração em tumores sólidos (Adams G.P., 2005; Denardo G.L., 2005; Isaacs J.D., 1996). No entanto, a eficácia destes anticorpos geralmente depende da sua capacidade em activar mecanismos imunológicos efectores, nomeadamente, a activação do complemento, não sendo por vezes eficazes, quando não ocorre a activação destes mecanismos, por existirem factores inibidores do complemento (Salmon J.E., 1992).

A utilização de anticorpos de isótipo IgM é uma boa alternativa na terapia de síndromes hemato-oncológicas, já que este anticorpo é caracterizado como um óptimo activador de mecanismos imunológicos, nomeadamente do sistema complemento. Também é de salientar, que devido ao seu alto peso molecular haveria uma menor entrada nos tecidos sólidos saudáveis, diminuindo provavelmente os seus efeitos secundários.

O grupo de Imunologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo (Espanha), desenvolveu recentemente o anticorpo monoclonal BH1 (anticorpo IgM humano) que reconhece a molécula HLA-II (Diaz B., 2008). Este anticorpo apresenta efeito tumoricida frente a células leucémicas humanas, sugerindo que este anticorpo poderia proporcionar uma terapia eficaz em alguns processos tumorais hematológicos (principalmente linfocítica, e algumas leucemias mieloídes) (Diaz B., 2008).

---

Com a realização deste estudo, pretendeu-se verificar se o anticorpo BH1 pode estar associado a outros mecanismo anti-tumorais, independentes do sistema complemento, que possam originar eliminação das células tumorais ou alterar o seu crescimento.

Para tal, inicialmente efectuou-se a produção de anticorpo BH1 através da geração de ascites em ratos Nude. Verificou-se que este hibridoma é capaz de originar ascite e não tumor sólido nos ratos, mas a quantidade de anticorpo obtida é diferente em cada caso, sendo este facto devido às características individuais de cada rato utilizado.

Em relação ao efeito do anticorpo BH1 em linhas tumorais de origem linfóide, os estudos “in vitro” mostram que ao contrário do que acontece com o anticorpo Ch-Lym1 que activa uma agregação homotípica das células Daudi e Hmy-2 a 37°C, o anticorpo BH1 não produz nenhuma alteração visível ao microscópio invertido. Se bem, que os dois anticorpos reconhecem o HLA-II, no entanto, a ligação a diferentes epítopes ou determinantes antigénicos vai provocar efeitos diferentes nas células, e provavelmente a activação de diferentes cascatas de sinalização intracelular. Durante estes ensaios tentou-se também avaliar o possível efeito citotóxico do anticorpo BH1 mediante a detecção da enzima LDH (Lactato Deshidrogenase) no sobrenadante da cultura celular, mas os próprios constituintes da ascite interferem no teste (dados não apresentados) pelo que é necessário purificar o anticorpo para obter resultados fiáveis.

Um dos mecanismos que podem levar os anticorpos à eliminação de células tumorais é a fagocitose (Akewanlop C. et al., 2001), assim este processo pode ser desenvolvido por diferentes tipos de células efectoras, como o PBMC activado com GM-CSF e PMN, pelo que é um factor a ter em conta na aplicação dos anticorpos na terapia humana. Assim, mediante o uso da Citometria de fluxo verificou-se, nos dois casos avaliados, a activação da fagocitose pelo anticorpo Ch-Lym1 usando ambos tipos de efectores (PBMC e PMN). Como era esperado a percentagem de células fagocitadas aumenta quando a relação célula efectora / célula tumoral é maior. Pelo contrário, os resultados obtidos com o anticorpo BH1, não foram tão satisfatórios, já que apenas em 1 dos casos foi activada a fagocitose (com PBMC e com PMN), o que poderia explicar-se pelas variantes alélicas dos receptores para o Fc da IgM, as quais podem influir na capacidade fagocítica das células dos diferentes indivíduos. Além disso, a percentagem de fagocitose mediada pelo anticorpo BH1 nunca foi superior aos valores obtidos com Ch-Lym1, provavelmente isto é devido ao facto dos receptores responsáveis pela activação da fagocitose que ligam o Fc da IgG serem muito mais efectivos que os que ligam o Fc da IgM

Desta forma, tendo em conta os estudos publicados recentemente por Díaz B. et al., que propunham o anticorpo BH1 como agente terapêutico devido à sua capacidade de activar o complemento. Os nossos resultados aconselhariam a troca de isótipo (de IgM a IgG humana) para melhorar a activação de outros mecanismos efectores, como a fagocitose.

---

## 6- Bibliografia

- Abhyankar, V.V., Lucas, M.S., Lin, T.S., Mone, A., Stock, W., Aron, J.L. et al (2002). Phase I study of thrice weekly dosing of Hu1D10 in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): preliminary observations in toxicity and biologic data. ASCO; 1069.
- Adams, G.P., Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of câncer. Nat Biotechnol 23:1147-1157.
- Alves, C., Souza, T., Veiga, S., Alves, C.O., Toralles, M.B., Lemaire, D. (2005). A importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. Pediatria.;27(4): 274-86.
- Bell, D.A., Hahn, B., Harkiss, G. (1992).Idiotypes, antibodies and immunopathology. Lupus 1: 335-337.
- Berger, M., Shankar, V., Vafai, A. (2002). Therapeutic applications of Monoclonal Antibodies. Am J Med Sci; 324: 14-30.
- Bird, R.E., Hardaman, K.D., Jacobson, J.W., Johson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope S.H., Riordan G.S., Whitlow M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. Science 242:423-426.
- Blattman, J.N., Greenberg, P.D. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses, Sciences; 305-200-5.
- Bonner, J., Harari, P.M., Giralt, J. (2004). Cetuximab (ErbixTM) Prolongs Survival in Patients with Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Phase III Study of High Dose Radiation Therapy with or without Cetuximab. Proc Am Soc Clin Oncol 22:5502 5507.
- Breitz, H.B., Tyler A., Bjorn, M.J., Lesley, T., Weiden, P.L. (1997). Clinical experience with Tc-99m nofetumomab merpentan (Verluma) radioimmunosintigraphy. Clin Nucl Med 22:615-620.
- Brennan, M., Davidson, F.P., Paulus, H. (1985). Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. Science 229:81-83.
- Bruggemann, M., Cskey, H.M., Teale, C., Waldmann, H., Williams, G.T., Surani, M.A., Neuberger, M.S. (1989). A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. Proc Natl Acad Sci 86 (17):6709-6713.

- 
- Burnet F.M. (1959). The clonal selection theory. Nashville: Vanderbilt University Press.
  - Burton, D.R., Gregory, L., Jefferis, R. (1986). Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. *Monogr Allergy* 19: 7-35.
  - Burton, D.R., Woof, J.M. (1992). Human antibody effector function. *Adv Immunol*; 51: 1-84.
  - Casadevall, A. (1996). Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2 200-208.
  - Cebrián, M., Yague, E., Rincón, M., López-Botet, M., de Landázuri, M.O., Sánchez-Madrid, F. (1988). Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J.Exp. Med.* 168, 1621-1637.
  - Cohen, A.D., Luger, S.M., Sickles, C., Mangan, P.A., Porter, D.L., Schuster, S.J., Tsai, D.E., Nasta, S., Gewirtz, A.M., Stadtmauer, E.A. (2002). Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) monotherapy for relapsed AML after hematopoietic stem cell transplant: efficacy and incidence of hepatic veno-occlusive disease. *Bone Marrow Transplantation* 30: 2328.
  - Coleclough, C., Perry, R.P., Karjalainen, K. and Weigert, M. (1981). Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* 290 372-378.
  - Denardo, G.L, Tobin, E., Chan, K., Bradt, B.M., Denardo, S.J. (2005). Direct ntilymphoma effects on Human lymphoma cells of monotherapy and combination therapy with CD20 and HLA-DR antibodies and 90Y-labeled HLA-DR antibodies. *Clin Cancer Res* 11:7075s-7079s.
  - Díaz, B., Sanjuan, I., Gambón, F., Loureiro, C., Magadán, S., González-Fernandez, Á. (2008). Generation of a human IgM monoclonal antibody directed against HLA class II molecules: a potencial agent in the treatment of haematological malignancies.
  - Donadi, E.A. (2000). Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina*.;33:7-18.
  - Dreyer, W.J. and Bennett, J.C.: (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *ProcNatl Acad Sci U S A* 54 864-869.
  - EMEA /H/C/257 (2005). Comité de medicamentos de uso humano. Informe público europeo de evolución (EPAR) Palivizumab Denominación Común Internacional (DCI): SYNAGIS. EMEA.

- 
- EMEA /H/C/353 (2005). Comité de medicamentos de uso humano. Informe público europeo de evolución (EPAR) Trastuzumab Denominación Común Internacional (DCI): HERCEPTIN. EMEA.
  - EMEA /H/C/357 (2005). Comité de medicamentos de uso humano. Informe público europeo de evolución (EPAR) Mabcampath Denominación Común Internacional (DCI): Alemtuzumab. EMEA.
  - EMEA /H/C/0547 (2005). Comité de medicamentos de uso humano. Informe público europeo de evolución (EPAR) ZEVALIN Denominación Común Internacional (DCI): Ibritumomab tiuxetan. EMEA.
  - EMEA /H/C/0582 (2005). Comité de medicamentos de uso humano. Informe público europeo de evolución (EPAR) AVASTIN Denominación Común Internacional (DCI): Bevacizumab. EMEA.
  - EMEA/H/C/606 (2005). Comité de medicamentos de uso humano. Informe público europeo de evaluación (EPAR) XOLAIR Denominación Común Internacional (DCI) Omalizumab EMEA.
  - Ermert, K., Mitlohner, H., Schempp, W. and Zachau, H.G. (1995). The immunoglobulin kappa locus of primates. *Genomics* 25 623-629.
  - Fripiat, J.P., Williams, S.C., Tomlinson, I.M., Cook, G.P., Cherif, D., Le Paslier, D., Collins, J.E., Dunham, I., Winter, G. and Lefranc, M.P. (1995). Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 4 983-991.
  - Fugmann, S.D., Lee, I.L., Shockett, P.E., Villey, I.J., Shatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: Complexes, ends and transposition. *Annu Rev Immunol*; 18:495-527.
  - Fuster, D., Maurel, J., Muxi, A., Setoain, X., Ayuso, C., Martin, F., Ortega, M.L., Fuertes, S., Pons, F. (2003). Is there a role for (99m) Tc-anti-CEA monoclonal antibody imaging in the diagnosis of recurrent colorectal carcinoma? *Q J Nucl Med* 47:109-115.
  - Gall, W.E., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J. Konisberg, W.H. Edelman, G.M. (1968). The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. IV. The interchain disulfide bonds. *Biochemistry* 7:1973-1982.
  - Gilliland, L.K., Walsh, L.A., Frewin, M.R., Wise, M.P., Tone, M., Hale, G., Kioussis, D., Waldmann, H. (1999). Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies. *J. Immunol* 162: 3663-3671.

- 
- Gingrich RD, Dahle CE, Hoskins KF, Senneff MJ. (1990). Identification and characterization of a new surface membrane antigen found predominantly on malignant B lymphocytes. *Blood*; **75**: 2375–87.
  
  - Giusti, R.M., Shastri, K.A., Cohen, M.H., Keegan, P., Pazdur, R. (2007). FDA Drug Approval Summary: Panitumumab (Vectibix™). *Oncologist* 12(5):577-583.
  
  - Glennie M.J., Jonhson P.W. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol today* 21:403-410..
  
  - Glennie M.J., McBride H.M., Worth A.T., Stevenson G.T. (1987). Preparation and performance of bispecific F(ab'g)2 antibody containing thioether linked Fab'g fragments. *J immunol* 139:2367-75.
  
  - Gold, R., Hartung, H.P., Hohlfeld, R. (2006). Monoclonal antibodies improve therapy of relapsing multiple sclerosis. Molecular basis and clinical results of anti-VLA4 (natalizumab) therapy *Dtsch Med Wochenschr* 131(1-2):31-34. Gordon J.A. CD23: novel disease marker with a split.
  
  - Gorman S.D., Clark M.R. (1990). Humanisation of monoclonal antibodies for therapy. *Semin. Immunol* 2: 457-466.
  
  - Green, L.L. (1991). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: Xeno-Mouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*; 231: 11-23.
  
  - Holliger P., Prospero T., Winter G. (1993). "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Sci USA* 90:6444-6448.
  
  - Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffiths, A.D. and Winter, G. (1992). Building antibodies from their genes. *Immunol Rev* 130 41-68.
  
  - Hozumi, N., Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci*; 73: 3628-3632.
  
  - Hu, E., Glasky, M.S., Yun, A., Alauddin, M., Hornick, J.L., Lhawli, L.A., et al. (1995). A human-mouse chimeric Lym-1 monoclonal antibody with specificity for human lymphomas expressed in a baculovirus system. *Hum Antibod Hybridomas*; 6: 57-67.

- 
- Isaacs, J.D., Wing, M.G., Greenwood, J.D., Hazleman, B.L., Hale, G., Waldmann, H. (1996). A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. *Clin Exp Immunol* 106:427-433.
  - Jain, R.K. (1987). Transport of molecules across tumour vasculature. *Cancer Metastasis Ver* 6:559-593.
  - Kaminski, M.S., Tuck, M., Estes, J., Kolstad, A., Ross, C.W., Zasadny, K., Regan, D., Kison, P., Fisher, S., Kroll, S., Wahl, R.L. (2005). <sup>131</sup>I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N Engl J Med* 352(5):496-498.
  - Kathula, S. K., Singh, J., Malani, A. K., Pabla, M., Takita, M., Matsumura, T., Kami, M., Pride, Y. B., Hillmen, P. (2006). Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria *N Engl J Med* 355:2786-2788.
  - Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature*; 350: 423-426.
  - Klein J, Sato A. (2000). The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med.*; 343(10):702-9.
  - Kohler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256: 495-497.
  - Kortt, A.A., Lah, M., Oddie, G.W., Gruen, L.C., Burns, J.E., Pearce, L.A., Atwell, J.A., McCoy, A.J., Howlett, G.J., Metzger, D.W., Webster, R.G., Hudson, P.J. (1997). Single chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five and ten residue linkers form dimers and with zero residue linker a trimer. *Protein Eng* 10:423-433.
  - Kuby, J., Cameron, J., Todd, C., Mitchell, J., (2002). *Kuby Imunologia*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda.
  - Landsteiner, K. (1946). The specificity of serological reactions. Harvard University Press.
  - Landsteiner, K., Springer, E.D. (1933). Die Spezifität der serologischen Reaktionen. Berlin.
  - Lesk, A.M., Chothia, C. (1982). Evolution of proteins formed by beta-sheets. II. The core of the immunoglobulin domains. *J Mol Biol* 160(2):325-342.

- 
- Lorber, M. I., Fastenau, J., Wilson, D., Dicesare, J., Hall, M. L. (2000). A prospective economic evaluation of basiliximab (Simulect®) therapy following renal transplantation Clinical transplantation 14: 479-485.
  
  - Magadán, S., Valladares, M., Suarez, E., Sanjuan, I., Molina, A., Ayling, C., Davies, S., Zou, X., Williams, G.T., Neuberger, M.S., Bruggemann, M., Gambón, F., Díaz-Espada, F., González-Fernández, A. (2002). Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from translocus mice: comparison of mice carrying IgH/kappa/lambda transloci. BioTechniques 33, 680-690.
  
  - Malki A., Owunwanne A., Elgazzar A., Adbel-Dayem H.M. (1999). Assessment of skeletal muscle damage in experimental animal using In-111 antimyosin. Int J Surg Investig 1:99-105.
  
  - Martin, F., Toniatti, C., Salvati, A.L., Venturini, S., Ciliberto, G., Cortese, R., Sollazzo, M. (1994). The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. EMBOJ 13:5302-5309.
  
  - Matsuda, F., Shin, E.K., Nagaoka, H., Matsumura, R., Haino, M., Fukita, Y., Taka-ishi, S., Imai, T., Riley, J.H. and Anand, R. (1993). Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. Nat Genet 3 88-94.
  
  - Max, E.E. (1998). Immunoglobulins: molecular genetics. In: Fundamental Immunology, 4<sup>th</sup> ed., WE Paul ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
  
  - Milstein C. (1986). From antibody structure to immunological diversification of immune response. Science 231: 1261-1268.
  
  - Milstein C. (1991). Affinity maturation of antibodies. Immunol today 12: 93-94.
  
  - Molina, A., Valladares, M., Magadán, S., Sancho, D., Viema, F., Sanjuán, I., Gambón, F., Sánchez-Madrid, F., González-Fernández, A., (2003). The use of transgenic mice for the production of a human monoclonal antibody specific for human CD69 antigen. J Immunol Methods 282: 147-158.
  
  - Nicholson, I.C., Zou, X., Popov, A.V., Cook, G.P., Corps, E.M., Humphries, S., Ayling, C., Goyenechea, B., Xian, J., Taussig, M.J., Neuberger, M.S., Bruggemann, M. (1999). Antibody repertoires of four- and five-feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. J Immunol 1999; 163: 6898-6906.



- 
- Papkoff J. (2007) New solid tumor targets for therapeutic monoclonal antibodies. *Expert Opin Ther Targets*.11(5):585-8.
  
  - Papp, K.A., Caro, I., Leung, H.M., Garovoy, M., Mease, P.J. (2007). Efalizumab for the treatment of psoriatic arthritis. *J Cutan Med Surg* 11(2):57-66.
  
  - Piccaluga P., Martinelli G. and Baccarani M. (2006). Advances in the treatment for haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother.*; 7:721-32.
  
  - Potter, M., Boyce, C. (1962). Induction of plasma cells neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature*; 193: 1086-1087.
  
  - Rech, J., Repp, R., Rech, D., Stockmeyer, B., Dechant, M., Niedobitek, G., Gramatzki, M., Valerius, T. (2006). A humanized HLA-DR antibody (hu1D10, apolizumab) in combination with granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a pilot study. *Leuk Lymphoma*. Oct;47(10):2147-54.
  
  - Rudbach, J.A., Cantrell, J.L., Ulrich, J.T. (1995). Methods of immunization to enhance the Immune Response to specific antigens in vivo preparation for fusions yielding Monoclonal Antibodies. *Methods Mol Biol*; 45: 1-8.
  
  - Salmon, J.E., Edberg, J.C., Brogle, N.L., Kimberly, R.P. (1992). Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. Apr;89(4):1274-81.
  
  - Sharkey, R.M. and Goldenberg, D.M. (2006). Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates. *CA Cancer J Clin.*;56(4):226-43.
  
  - Sweet, B. V. (2007). Natalizumab update. *Am J Health Syst Pharm* 64: 705-716.
  
  - Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., Rutgeerts, P.J. (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 337:1029-1035.
  
  - Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S. and Bernardini, A. (1974). Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 4027-4031.
  
  - Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302 575-581.

- 
- Yoo, E.M., Chintalacharuvu, K.R., Penichet, M.L., Morrison, S.L. (2002). Myeloma expression systems. *J Immunol Methods*; 261, 1-20.
  
  - Watanabe, M., Wallace, O.K., Keler, T., Deo, Y.M., Akewanlop, C., Hayes, D.F. (1999). Antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of breast cancer cells mediated by bispecific antibody, MDX-210.
  
  - Weissman, I. (1994). Developmental switches in the immune system. *Cell*; 76:207.
  
  - William, E.P. (1999). *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 4<sup>th</sup>. Ed.
  
  - Winter G., Milstein C. 1991. Man-made antibodies. *Nature* 349:293-299.
  
  - Winter, G. and Harris, W.J. (1993). Humanized antibodies. *Immunol Today* 14 243-246.
  
  - Witkop, B. (1999). Paul Ehrlich and his Magic Bullets-revisited. *Proc Am Philos Soc*; 143: 540-57.
  
  - Wu, T.T., Kabat, E.A. (2000). Kabat Database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res*: 28: 214-218.